

Université de Montréal

**Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la  
régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF-3, de son  
activation à sa dégradation**

par

Louis-Dominic Tremblay

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

Avril 2005

© Louis-Dominic Tremblay, 2005





## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la  
régulation de l'activité transcriptionnelle d'IRF-3: de son  
activation à sa dégradation

présenté par :  
Louis-Dominic Tremblay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Huy Ong  
président-rapporteur

Dr. Marc Servant  
directeur de recherche

Dr. Nathalie Grandvaux  
membre du jury

**Résumé :** Le facteur de transcription IRF-3 (Interferon-Regulatory Factor) possède un rôle clé, chez les organismes supérieurs, dans l'induction d'une stratégie de lutte contre les pathogènes, en régulant l'expression des interférons de type I et des gènes inductibles par les interférons. Son activation est contrôlée, suite à l'infection, par une série de protéines membranaires et intracellulaires, dont les Toll-like receptors (TLR) et TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF). La phosphorylation de la protéine TRIF est une étape probable de la cascade de signalisation, mais les détails concernant ce phénomène sont encore obscurs. Nous avons cherché à identifier les sites possibles de phosphorylation de TRIF. Nous avons également montré que les bactéries *Salmonella typhimurium* et *Escherichia.coli* entéropathogène, activant les TLR, étaient capables d'infecter des cellules en bloquant l'activation d'IRF-3. Enfin, nous avons mis en évidence que la sous-unité Skp2 du complexe d'ubiquitine ligase SCF interagissait avec IRF-3 et favorisait sa dégradation.

**Mots clés:** Immunologie, IRF-3, Toll-like receptors, TRIF, *Salmonella typhimurium*, *E.coli*, ubiquitination, protéolyse.

**Abstract** : The transcription factor IRF-3 (Interferon-Regulatory Factor) has a key role, among superior organisms, in establishing a defensive strategy directed against invading pathogens, by regulating type I interferons and interferon-inductible genes expression. Its activity is controlled, following infection, by numerous transmembrane and intracellular proteins, including Toll-like receptors (TLRs) and TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$  (TRIF). A probable and still obscure step in the signaling cascade is the phosphorylation of the protein TRIF. We sought to identify the putative phosphorylation sites of TRIF. We have also found the ability of the TLR activating bacteria *Salmonella typhimurium* and enteropathogenic *Escherichia coli* to infect cells by bypassing the activation of IRF-3. Finally, we have shown an interaction between IRF-3 and the SCF ubiquitin-ligase subunit Skp2 and a capacity of the latter to induce the degradation of the transcription factor.

**Key words**: Immunology, IRF-3, Toll-like-receptors, TRIF, *Salmonella typhimurium*, *E.coli*, ubiquitination, proteolysis.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>PAGE DE TITRE .....</b>	<b>p. 1</b>
<b>IDENTIFICATION DU JURY .....</b>	<b>p. 2</b>
<b>RESUME EN FRANCAIS .....</b>	<b>p. 3</b>
<b>RESUME EN ANGLAIS .....</b>	<b>p. 4</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....</b>	<b>p. 8</b>
<b>SIGLES ET ABBREVIATIONS.....</b>	<b>p. 10</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>p. 12</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>p. 13</b>
 <b>1) Immunité adaptative .....</b>	 <b>p. 14</b>
 <b>2) Immunité innée .....</b>	 <b>p. 16</b>
<b>2.1) Cellules impliquées dans l'immunité innée .....</b>	<b>p. 17</b>
a) Cellules dendritiques .....	p. 17
b) Macrophages .....	p. 18
c) Cellules tueuses naturelles .....	p. 18
<b>2.2) <i>Pattern recognition receptors</i> .....</b>	<b>p. 20</b>
A) Récepteurs intracellulaires .....	p. 20
i) Protéines NBS-LRR .....	p. 20
ii) RIG-I .....	p. 21
B) Récepteurs membranaires .....	p. 22
i) Récepteur du complément de type 3 .....	p. 22
ii) Récepteurs <i>scavengers</i> .....	p. 22
iii) Dectine-1 .....	p. 23
iv) Récepteur du mannose .....	p. 23
v) <i>Toll-like receptors</i> .....	p. 24
<b>2.2.1) Les Toll-like receptors .....</b>	<b>p. 24</b>
2.2.1.1) Toll chez <i>Drosophila melanogaster</i> .....	p. 24

2.2.1.2) Découverte des Toll-like receptors .....	p. 26
2.2.1.3) Structure, classification et ligands des TLR ..	p. 27
a) TLR1, TLR2 et TLR6 .....	p. 29
b) TLR 5 .....	p. 30
c) TLR7 et TLR8 .....	p. 30
d) TLR9 .....	p. 31
e) TLR10 .....	p. 32
f) TLR4 .....	p. 32
g) TLR3 .....	p. 35
2.2.1.4) Voies de signalisation liées aux TLR .....	p. 38
a) Voie MyD88 dépendante .....	p. 39
b) Voie MyD88 indépendante .....	p. 44
3) Les interférons .....	p. 51
3.1) Effets cellulaires et mécanismes de défense activés .....	p. 54
3.1.1) Système 2-5A .....	p. 55
3.1.2) Système Mx .....	p. 56
3.1.3) PKR .....	p. 57
3.2) Régulation de l'expression des interférons: les IRF .....	p. 58
3.2.1) IRF-3 .....	p. 60
3.2.1.1) Kinases impliquées dans l'activation d'IRF-3 .....	p. 64
3.2.1.2) Dégradation d'IRF-3 .....	p. 68
4) Pathogènes bactériens .....	p. 69
4.1) <i>Salmonella typhimurium</i> .....	p. 70
4.2) <i>Escherichia coli</i> .....	p. 70
5) Hypothèses .....	p. 72



<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>p. 74</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>p. 80</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>p. 100</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>p. 109</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>p. 110</b>

## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

<b>Figure 1:</b> Hématopoïèse: les cellules-souches hématopoïétiques et leurs dérivés sanguins .....	<b>p. 19</b>
<b>Figure 2:</b> Protéines NBS-LRR. ....	<b>p. 21</b>
<b>Figure 3:</b> Comparaison entre la voie de signalisation associée au Toll de la drosophile et à celle reliée aux récepteurs TLR et IL-1R des mammifères, médiée par NF- $\kappa$ B. ....	<b>p. 25</b>
<b>Figure 4:</b> Membres de la superfamille <i>interleukin-1 receptor/Toll-like receptor</i> .....	<b>p. 28</b>
<b>Figure 5:</b> Arbre phylogénique des Toll-like receptors humain. ....	<b>p. 29</b>
<b>Figure 6:</b> Réceptosome TLR4. ....	<b>p. 35</b>
<b>Figure 7:</b> TLR et leurs ligands. ....	<b>p. 38</b>
<b>Figure 8:</b> Voie de signalisation dépendante de MyD88 reliée à la signalisation des TLR. ....	<b>p. 42</b>
<b>Figure 9:</b> Rôles de TIRAP et MyD88 dans la signalisation reliée à TLR4 et TLR2. ....	<b>p. 44</b>
<b>Figure 10:</b> Représentation linéaire schématique des domaines de TRIF et des protéines s'y associant. ....	<b>p. 48</b>
<b>Figure 11:</b> Voies de signalisations médiées par TRIF lors de la stimulation de TLR3 par l'ARN double-brin. ....	<b>p. 50</b>
<b>Figure 12:</b> La coimmunoprécipitation de TRIF et TBK1 montre sur SDS-PAGE une forme de TRIF migrant plus lentement que la coimmunoprécipitation de TRIF et TBK1 KN. ....	<b>p. 51</b>
<b>Figure 13:</b> Voies de signalisation impliquant les JAK/STAT reliées aux récepteurs des IFN. ....	<b>p. 53</b>
<b>Figure 14:</b> Systèmes antiviraux induits par les interférons (IFN). ....	<b>p. 54</b>
<b>Figure 15:</b> Cycle de eIF-2 et rôle de PKR dans son inhibition. ....	<b>p. 58</b>
<b>Figure 16:</b> Représentation linéaire schématique du facteur de transcription IRF-3 et de ses sites phosphoaccepteurs. ....	<b>p. 62</b>

<b>Figure 17:</b> Représentation schématique de l'activation d'IRF-3/IRF-7 par la voie TRIF/TBK1 et de l'induction de la transcription d'IFN de type I, suite à la stimulation de TLR. ....	<b>p. 67</b>
<b>Tableau I :</b> Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de TRIF .....	<b>p. 74</b>
<b>Figure 18:</b> Représentation schématique de la production <i>in vitro</i> de Myc-Skp2 et flag-IKK-ε, de l'essai kinase par flag-IKK-ε sur His-IRF-3, du couplage de His-IRF-3 avec Myc-Skp2 et du « pull-down » nickel-sépharose sur His-IRF-3. ....	<b>p. 78</b>
<b>Figure 19 :</b> Sites prédits de phosphorylation de IRF-3 et leur accessibilité.....	<b>p. 80</b>
<b>Figure 20:</b> Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron-β, ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la stimulation par diverses quantités de poly(I :C). ....	<b>p. 83-84</b>
<b>Figure 21:</b> Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron-β, ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la stimulation par 0,1ng de poly(I :C), suite à la transfection de mutants TRIF S270A, S359A et S673A. ....	<b>p. 86-87</b>
<b>Figure 22:</b> Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron-β, ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la transfection de différentes quantités de TRIF S270D, S359D et S673D. ...	<b>p. 89-90</b>
<b>Figure 23:</b> S.typhimurium n'active pas IRF-3 chez des cellules HeLa. ...	<b>p. 92-93</b>
<b>Figure 24:</b> E.coli n'active pas IRF-3 chez des cellules HeLa. ....	<b>p. 95</b>
<b>Figure 25:</b> S. typhimurium et E. coli n'activent pas IRF-3 chez des cellules HeLa, tel que démontré par EMSA. ....	<b>p. 95-96</b>
<b>Figure 26:</b> Interaction <i>in vitro</i> de Myc-Skp2 et His-IRF-3. ....	<b>p. 98</b>
<b>Figure 27:</b> Dégradation de flag-IRF-3 par la surexpression de Myc-Skp2. ....	<b>p. 99</b>
<b>Figure 28:</b> Complexe SCF-ubiquitine ligase proposé pour l'ubiquitination de IRF-3. ....	<b>p. 107</b>

## SIGLES ET ABBREVIATIONS

**APC**: cellules présentatrices d'antigènes  
**BCR** : récepteur de lymphocytes B  
**CD** : cluster of differentiation  
**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité  
**CoV** : coronavirus  
**DBD**: domaine de liaison à l'ADN  
**DC**: cellule dendritique  
**dsRNA**: ARN double-brin  
**ecsit**: evolutionary conserved intermediate in Toll pathways  
**eIF**: eukaryotic translation initiation factor  
**EMSA**: Electrophoretic-mobility shift assay  
**EPEC**: *E.coli* entéropathogène  
**FAK** : focal-adhesion kinase  
**GAS** : gamma-activated sequence  
**GAS** : streptocoques de groupe A  
**HCV**: virus de l'hépatite C humain  
**HDL**: high density lipoproteins  
**HIV1**: virus d'immunodéficience humain  
**HSP** : heat-shock protein  
**HSV-1** : herpes simplex virus  
**IAD** : IRF association domain  
**IFN**: interféron  
**IL**: interleukine  
**IL-18R** : récepteur de l'interleukine 18  
**IKK**: I $\kappa$ B kinase  
**IMD**: immune deficiency  
**iNOS**: inducible NO synthase  
**IP-10**: interferon-inducible protein-10, immune protein-10  
**IRAK**: IL-1 receptor-associated kinases  
**IRF** : interferon-regulatory factor  
**ISG**: interferon-stimulated genes  
**ISGF**: IFN-stimulated gene factor  
**ISRE** : IFN-stimulated gene element  
**JAK**: Janus kinases  
**LDL**: low density lipoproteins  
**LPS**: lipopolysaccharide  
**LRR** : leucine-rich repeats  
**LT**: lethal toxin  
**LTA** : acide lipotéichoïque  
**Mal** : MyD88 adaptor-like  
**MCMV** : cytomégalovirus murin  
**MDC** : DC myéloïdes  
**MH2** : Mad homology domain 2  
**MHC**: complexe majeur d'histocompatibilité  
**MV** : vésicules membranaires  
**MVB** : corps multivésiculaires

**MyD88:** myeloid differentiation factor 88  
**NBS:** nucleotide binding site  
**NDV:** Newcastle disease virus  
**NEMO:** NF- $\kappa$ B essential modulator  
**NES:** nuclear exportation signal  
**NF- $\kappa$ B :** Nuclear factor-  $\kappa$ B  
**NK:** natural killer  
**NOD:** nucleotide-binding oligomerization domain  
**OAS :** 2-5oligoadénylate synthétases  
**oxLDL:** LDL oxydés  
**PAMP:** pathogens-associated molecular patterns  
**PDC:** DC plasmacytoïdes  
**PGN:** peptidoglycane  
**PIAS:** protein inhibitor of activated STAT  
**PRD:** positive regulatory domain I  
**PRR:** pattern recognition receptors  
**RHIM:** RIP homotypic interaction motif  
**RIG-I:** retinoic acid inducible gene I  
**RING :** really interesting new gene  
**RIP1:** receptor-interacting protein  
**SCF :** Skp1-Cullin1-Fbox  
**SCV :** Salmonella-containing vacuole  
**SDS-PAGE :** sodium-dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis  
**SeV:** virus de Sendai  
**SH2:** Src homology domain  
**Skp2:** S-phase kinase-associated protein 2  
**SOCS:** suppressor of cytokine signaling  
**SRAS:** syndrome respiratoire aigu sévère  
**ssRNA :** ARN simple-brin  
**STAT:** signal transducers and activators of transcription  
**TAB :** Tak1 binding protein  
**TAK1:** TGF- $\beta$ -activated kinase 1  
**TBK:** TANK-binding kinase  
**TCR:** récepteur de lymphocytes T  
**TGF:** transforming growth factor  
**TIFA:** TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain  
**TIGGIR :** three immunoglobulin domain-containing IL1 receptor-related  
**TIR:** Toll-Interleukin-1 Receptor domain  
**TIRAP:** TIR domain-containing adapter protein  
**TLR:** Toll-like receptors  
**TNF:** tumor necrosis factor  
**TRAF:** tumor necrosis factor receptor-associated factors  
**TRAM:** TRIF-related adaptor molecule  
**TRIF:** TIR domain-containing adaptor inducing interferon- $\beta$   
**VAK :** Virus-activated kinase  
**Vhs:** virion host shut-off protein  
**VSV:** vesicular stomatitis virus

## **REMERCIEMENTS**

Je tiendrais à remercier le Dr. Brett Finlay pour les souches bactériennes et le Dr. Sylvain Meloche pour les constructions de Skp2. Ma gratitude également à tous les membres du labo, A. Bibeau-Poirier, A. Douillette., JF. Clément, M. Servant, SP. Gravel et V.Chénard pour leur aide et leurs encouragements. Enfin, merci à Julie et à ma famille pour leur soutien et leur appui.

## INTRODUCTION

Un défi auquel tout organisme vivant multicellulaire doit quotidiennement faire face est celui d'empêcher l'intrusion et la réplication de pathogènes, bactériens, viraux ou eucaryotes, désireux de profiter du milieu homéostatique et riche en nutriments qu'il constitue. Hôtes et pathogènes ayant conjointement évolués depuis des millions d'années, des systèmes de défense élaborés se sont développés, connus sous le nom de système immunitaire, auxquels furent opposés par les pathogènes des voies de contournement dont la diversité ne cesse de nous étonner. La découverte aux XIX<sup>e</sup> siècle de l'existence d'organismes pathogènes microscopiques, les « microbes », signa l'acte de naissance des disciplines fécondes que sont l'immunologie et la microbiologie et permit à la médecine de gigantesques avancées. Une des caractéristiques principales du système immunitaire est sa capacité à discriminer le *soi* du *non-soi*, c'est-à-dire de s'attaquer à l'envahisseur, tout en épargnant les composantes propres de l'organisme. Un dérèglement de cette fonction est à l'origine de ce qu'on appelle les maladies auto-immunes (5).

La moelle osseuse, où résident les cellules hématopoïétiques, qui sont les précurseurs des cellules sanguines (lymphocytes, granulocytes, érythrocytes ou plaquettes), est le site de production des cellules immunitaire majeures, et le site de maturation de certaines d'entre elles. La migration de celles-ci vers les tissus périphériques, le sang et le système lymphatique assure une surveillance constante contre les pathogènes (126).

La complexité du système immunitaire a forcé la mise en place d'un système de communication élaboré entre les diverses cellules : les cytokines sont un groupe hétérogène de protéines affectées à un tel rôle (139). Leur effet est en général médié par des récepteurs spécifiques sur où à l'intérieur des cellules cibles et un parallèle pourrait être fait avec le mécanisme d'action de certaines hormones (139). Dans la catégorie des cytokines, se retrouvent principalement les interleukines (IL), impliquées entre autre dans la prolifération et la différenciation cellulaire, les TNF proinflammatoires et les interférons (IFN) (139). Ces derniers, qui seront traités en détail plus loin, sont essentiels, par leur capacité à induire des gènes impliqués dans le blocage de la réplication et de la dissémination virale et bactérienne (158), à la lutte contre les pathogènes. Une stratégie de défense immunitaire implique donc une

émission coordonnée et rigoureusement régulée de messagers chimiques signifiant aux diverses cellules la présence d'envahisseurs et les incitant à y répondre.

Une telle régulation est prise en charge par des facteurs de transcription qui sont capable de moduler l'expression des gènes par leur liaison à des sites spécifiques de l'ADN. Le facteur de transcription IRF-3 se distingue par son rôle majeur dans la régulation de l'expression des interférons de type I (16), alors que NF- $\kappa$ B contrôle, entre autres, celle d'interleukines (IL-1, IL-2, etc.), de l'IFN- $\beta$ , de TNF- $\alpha$ , des molécules d'adhésion VCAM et ICAM et de la chimiokine RANTES (80). Les connaissances actuelles sur les mécanismes moléculaires d'activation de ces facteurs de transcription seront décrites plus bas.

### **1) Immunité adaptative**

Jusqu'à très récemment, la dénomination de système immunitaire faisait référence uniquement à ce que nous appelons l'immunité adaptative. Par ce terme, on met en évidence la capacité de l'organisme à adapter sa réponse contre un antigène donné et à concentrer ses efforts sur son éradication. En général, la réponse immunitaire adaptative confère une immunité protectrice contre la réinfection par un même pathogène (126). Le système adaptatif se subdivise en deux grandes classes : l'immunité humorale et l'immunité cellulaire (253).

L'immunité humorale implique la production par les lymphocytes B d'anticorps circulant dans l'organisme et capables de se lier à l'antigène contre lequel ils sont dirigés, neutralisant ainsi virus ou toxines bactériennes et les destinant à la destruction par phagocytose ou par activation du complément (5).

L'immunité cellulaire fait entrer en jeu les lymphocytes T (produits dans le thymus), dont le rôle est l'éradication de cellules infectées par des virus, des mycètes ou autres (253). Les lymphocytes T, caractérisés par l'expression de protéines CD8 à leur surface (126) possèdent des récepteurs hétérodimériques (TCR), de structure semblable à celle des immunoglobulines, capables de reconnaître un antigène (5). Le lymphocyte T cytotoxique CD8+ lié à son antigène détruit la cellule infectée en perçant sa membrane à l'aide d'une protéine nommée perforine (168).

Les lymphocytes T comprennent également un autre groupe, les auxiliaires (*helpers*), dont les membres expriment à leur surface la molécule CD4. Ceux-ci se



subdivisent eux-mêmes en  $CD4^+ T_H1$  et en  $CD4^+ T_H2$  (126). Suite à la reconnaissance d'antigènes présentés sur des CMH de type II, à la surface de macrophages infectés par des bactéries intracellulaires, les  $CD4^+ T_H1$  activent ceux-ci et enclenchent la destruction lysosomiale des pathogènes, en plus de relâcher cytokines, comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (4), et chimiokines attirant les macrophages au site d'infection (126). Les  $CD4^+ T_H2$ , les véritables *helper cells*, ont pour rôle principal la destruction de pathogènes extracellulaires dont les antigènes ont été internalisés et présentés par des APC, en activant les lymphocytes B (126).

Les lymphocytes B activés se différencient principalement en plasmocytes spécialisés dans la sécrétion d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique (253). Peu d'antigènes sont capables d'activer directement les lymphocytes B, sans l'aide des  $CD4^+ T_H2$  (126). Ceux-ci sécrètent, entre autres, les interleukines (IL) 4, 5, 10 et 13 (4). Pour leur rôle dans la coordination de l'activation de différentes cellules immunitaires, les lymphocytes auxiliaires sont souvent appelés chefs d'orchestre du système immunitaire: les effets majeurs sur l'immunité causés par leur destruction par le VIH suffisent à illustrer leur importance.

Centrale au système immunitaire adaptatif est la théorie de la sélection clonale : l'organisme produit, par réarrangement somatique un nombre phénoménal d'immunoglobulines et de récepteurs de lymphocytes B (BCR) et T (TCR) (259). Lorsque une cellule portant un récepteur donné reconnaît son antigène, elle entreprend une multiplication en cellules-sœurs identiques (clones) dirigées contre le même antigène (253). Comme un pathogène donnée présente de nombreux antigènes, son élimination est entreprise par une série de lymphocytes différents dirigés contre lui.

Les différentes cellules immunitaires portant des récepteurs à antigènes subissent un tri dans les organes lymphoïdes centraux, la moelle osseuse et la rate pour les lymphocytes B et le thymus pour les lymphocytes T, où ceux qui reconnaissent des antigènes reliés au soi sont éliminés (193). On a récemment découvert un facteur de transcription, nommé AIRE, qui régule l'expression dans le thymus de gènes normalement exprimés dans divers tissus, et dont les produits servent à représenter une grande variété d'antigènes du soi (159). Les milliards de possibilités de récepteurs différents impliqués dans l'immunité adaptative (BCR, TCR, Ig) proviennent du réarrangement de gènes au niveau somatique (sôma :

corps) : par opposition, les récepteurs reliés à l'immunité innée ont une diversité de plusieurs ordres de grandeurs inférieurs et ils sont transmis intégralement, de façon germinale (i.e. par les gamètes) entre les générations.

## **2) Immunité innée**

Au cours des deux dernières décennies, un volet original et jusqu'alors négligé de l'immunité a fait son apparition : l'étude de l'immunité innée. Longtemps considérée comme une réponse immunitaire non spécifique de phagocytose d'envahisseurs par les leucocytes, l'immunité innée a depuis révélé sa spécificité et sa capacité de discernement entre le soi et le non-soi (4). Les immunologistes étaient en effet subjugués par le système immunitaire adaptatif, et les tentatives afin de donner un rôle significatif au système inné ont échouées jusque dans les années 80-90. Charles A Janeway a, dans le cadre d'une conférence en 1989, le premier suggéré que l'immunité innée soit le préambule, via la reconnaissance de produits microbiens par des récepteurs alors encore inconnus, à l'immunité adaptative (9). Cette proposition alors marginale a été confirmée en 1997 et 1998 par deux publications dont il sera question plus loin (172, 200) : le domaine de l'immunité innée a depuis ouvert la porte à une nouvelle avenue de recherche aux possibilités thérapeutiques énormes.

Dans la catégorie de l'immunité innée entrent plusieurs systèmes permettant l'éradication de pathogènes, et de plus en plus la voyons-nous interagir avec le système immunitaire adaptatif, pour lequel elle jouerait un rôle fondamental dans l'activation (194), par exemple en induisant la production de cytokines proinflammatoires et l'expression de molécules costimulantes (134). La finalité de l'induction de l'immunité innée serait l'induction de l'inflammation au site de l'infection et le recrutement local subséquent de cellules immunitaires, telles les macrophages. Encore une fois, la reconnaissance de ligands associés à des pathogènes par les cellules du système immunitaire inné se démarque de celle effectuée par le système adaptatif en faisant appel à des récepteurs n'étant pas le produit d'un réarrangement somatique.

La variété des systèmes de défense innée peut être illustrée par une stratégie de lutte contre l'invasion bactérienne récemment mise en évidence, qui implique la

lipocaline 2 : des souris en étant dépourvues étaient victimes d'infection beaucoup plus sérieuses par *E.coli* (66). Découverte pour son rôle dans l'organogénèse du rein, chez le rat (266), cette protéine limite la croissance bactérienne en empêchant l'acquisition de fer. Les bactéries puisent en effet leur fer chez l'hôte en sécrétant des sidérophores qui lient le fer, puis sont ramenés à la bactérie par leur liaison à des récepteurs spécifiques (260). La lipocaline 2 est capable de lier et d'ainsi séquestrer les sidérophores de type catécholate, les empêchant de ramener vers la bactérie le fer nécessaire à son métabolisme (66). Elle contribue ainsi à lutter contre les bactéries pourvues exclusivement de récepteurs à sidérophores de type catécholates ; l'existence de mécanismes semblables dirigés contre les autres sidérophores reste à démontrer.

### **2.1) Cellules impliquées dans l'immunité innée**

Une grande variété de cellules (épithéliales, musculaires, etc.) expriment des récepteurs impliqués dans l'immunité innée et sont capables d'induire une réponse immunitaire, cependant, se spécialisent dans cette fonction les macrophages, les cellules dendritiques (DC) (133) et les cellules tueuses naturelles (NK) (113). Ensemble, ces cellules participent à la capture initiale et au traitement des antigènes potentiels et à l'activation des lymphocytes B et T, en sécrétant des médiateurs chimiques responsables de l'induction et de la régulation de l'inflammation et de la réponse immunitaire (84) et/ou en présentant les antigènes (113). Les macrophages et DC sont issus d'un précurseur commun, le progéniteur myéloïde, alors que les NK proviennent de la différenciation du progéniteur lymphoïde (126) (Figure 1).

#### **a) Cellules dendritiques**

Le rôle le mieux connu des DC est la présentation d'antigènes aux lymphocytes T, dont ils sont les activateurs les plus puissants, lorsque matures. En périphérie, les cellules dendritiques immatures sont fortement endocytiques, mais de mauvaises présentatrices d'antigènes (251). La stimulation de celles-ci par des ligands tels le lipopolysaccharide (LPS) bactérien, le CD40 ou le TNF $\alpha$  induit leur maturation et l'expression de complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de

classe II, ainsi que leur migration vers les ganglions lymphatiques, où ils présentent les antigènes aux lymphocytes T naïfs (122). La maturation des cellules dendritiques requiert l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (206), dont il sera question plus loin. Les cellules dendritiques sont le premier rempart, passée la barrière extérieure qu'est la peau, contre les envahisseurs pathogènes et les premières à être activées (247). Cette activation, en plus de les transformer en APC, induit leur production de cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 (IL-1), IL-6, TNF $\alpha$ ), de IL-12 et de molécules costimulatoires (CD80 et CD86) (247). L'IL-12 confère aux lymphocytes T un phénotype T<sub>H</sub>1 IFN $\gamma$ <sup>high</sup>IL5<sup>low</sup> et confère aux macrophages une meilleure capacité à détruire les pathogènes internalisés (147).

### **b) Macrophages**

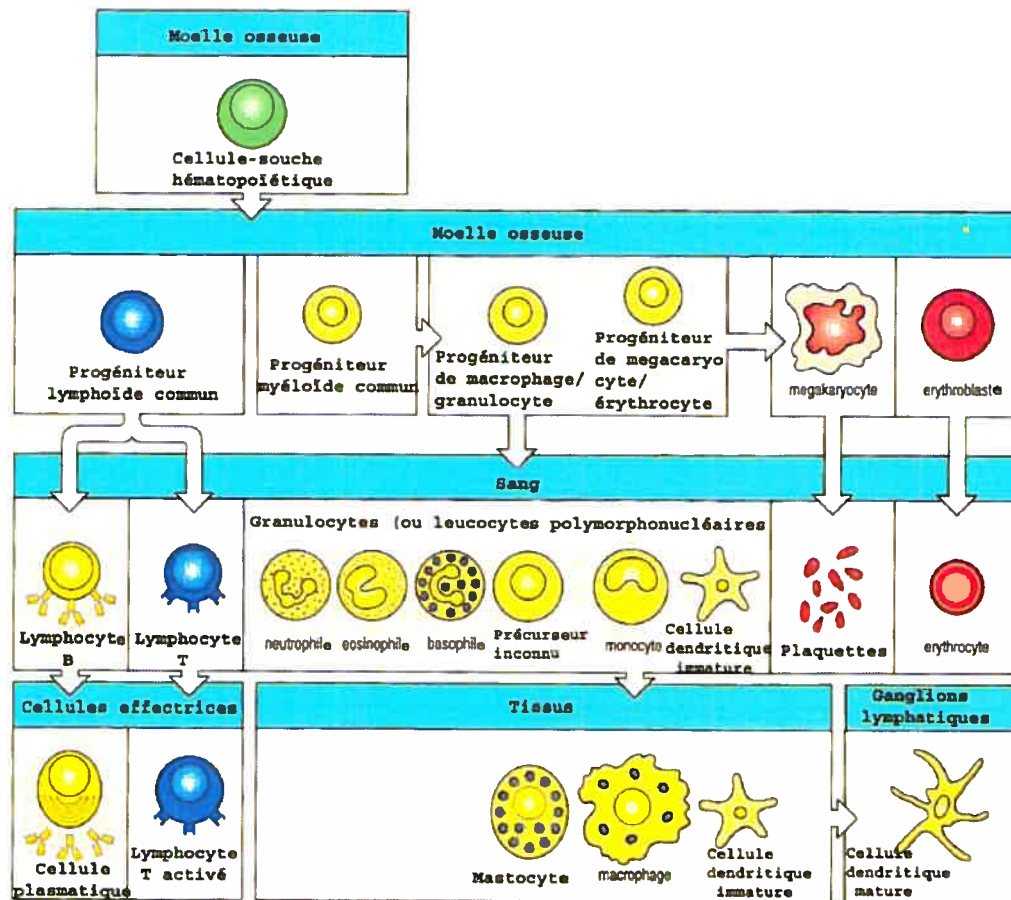
Les macrophages (« grands mangeurs ») sont des cellules phagocytiques myéloïdes, comme les DC, dont le rôle est semblable, au front de la lutte contre les pathogènes. Ils sont capables d'assurer l'élimination des cellules apoptotiques, en reconnaissant leurs *apoptotic cell-associated molecular patterns* (ACAMPs) (87), de présenter les antigènes (APC) et d'ainsi activer l'immunité adaptative (84). À l'image des DC et d'autres types cellulaires, ils expriment un grand nombre de récepteurs, capables de détecter des ligands endogènes, comme le CR3 pour le fibrinogène, ou exogènes, comme le TLR4 pour le LPS (84). Ils sécrètent cytokines et chimiokines, telles l'IL-12 et les IFN de type I (15) et sont capables d'induire l'inflammation (196).

### **c) Cellules tueuses naturelles**

Les cellules tueuses naturelles (NK) médient la cytotoxicité et produisent des chimiokines et des cytokines proinflammatoires telles l'IFN- $\gamma$  et le TNF (205). Elles attaquent, de façon précoce, les cellules infectées par des pathogènes et ont un rôle dans la destruction de cellules tumorales et la surveillance de tumeurs (205). Elles détectent les cellules tumorales ou infectées grâce à une série de récepteurs capables de reconnaître le « soi-induit » ou le « soi-manquant », c'est-à-dire la surexpression ou la sous expression, induite par la transformation ou l'infection, de molécules de

surface exprimées à un niveau donné dans des conditions normales (113). Ainsi, il y a modulation de l'immunité en fonction du niveau d'expression de protéines normalement associées au « soi ».

Loin de ce limiter aux seules cellules décrites ci-haut, les récepteurs impliqués dans l'immunité innée sont, il convient de le répéter, exprimés sur une pléthore de cellules, allant des cellules épithéliales aux cellules musculaires.



**Figure 1 : Hématopoïèse : les cellules-souches hématopoïétiques et leurs dérivés sanguins.** À partir d'un précurseur commun, les cellules souches hématopoïétiques, se différencient en progéniteurs lymphoïdes ou myéloïdes, selon la localisation, avant de générer les principales cellules immunitaires. Adapté de : Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Edition, Garland Publishing, New York, 2001.

## **2.2) Pattern recognition receptors**

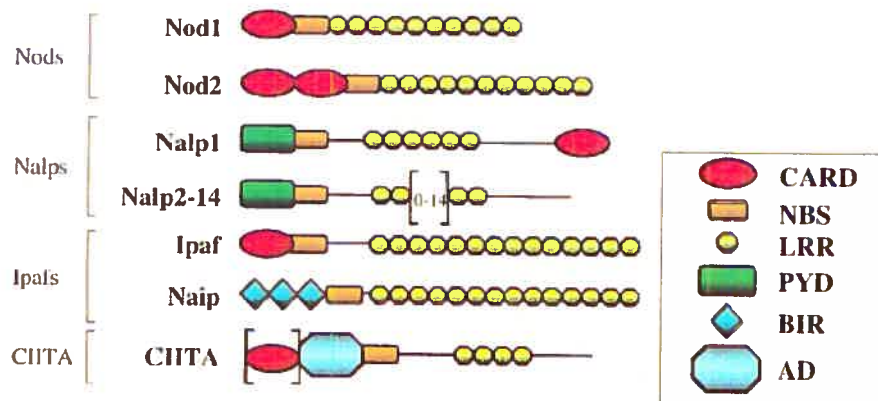
À la base de l'immunité innée se trouvent les *Pattern recognition receptors* (PRR) exprimés surtout à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC), comme les macrophages et les DC. Ceux-ci reconnaissent un vaste répertoire de structures, comprenant des protéines, des lipides, des saccharides et des acides nucléiques, d'origine exogène (84), nommés *Pathogens associated molecular patterns* (PAMPs), mais aussi des structures d'origine endogène. Ils ne sont pas, à l'instar des immunoglobulines, le produit de réarrangements somatiques de gènes. Leur nombre va croissant et seront ici répertoriés les mieux connus.

### **A) Récepteurs intracellulaires**

#### **i) Protéines NBS-LRR**

Les protéines *nucleotide-binding site and leucine-rich repeats* (NBS-LRR) sont capables de reconnaître les pathogènes et leurs dérivés à l'intérieur de la cellule (33). Il s'agit de protéines possédant des *leucine-rich repeats* (LRR) en C-terminal, dont le rôle est la reconnaissance de motifs liés aux pathogènes, un *nucleotide binding site* (NBS) requis pour leur oligomérisation, et un *caspase-activating and recruitment domain* (CARD) (33) (Figure 2). Les protéines *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), membres de cette famille, ont été identifiées pour leur rôle dans la reconnaissance du peptidoglycane (PGN) bactérien : NOD1, structurellement semblable au régulateur de l'apoptose Apaf-1, reconnaît l'acide  $\gamma$ -D-glutamyl-mesodiaminopimélique (iE-DAP) du PGN, alors que NOD2, semblable à NOD1 mais doté de 2 domaines CARD, en reconnaît le dipeptide MurNAc-L-Ala-D-isoGln (MDP) (241). Ces deux NOD reconnaissent donc des composants différents du PGN bactérien. L'oligomérisation des NOD, suite à la reconnaissance de leur ligand, est nécessaire au recrutement, via leurs domaines CARD, de la sérine/thréonine kinase RIP2/RICK (123), qui mène ultimement à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (241). L'importance des NOD dans la modulation de l'inflammation peut être illustrée par le fait que des mutations dans le gène *nod2* sont associées à une susceptibilité à la maladie de Crohn et au syndrome de Blau (33).

Nod2 serait de plus impliquée dans l'élimination de la bactérie intracellulaire *Salmonella* dans les cellules épithéliales intestinales (109).



**Figure 2: Protéines NBS-LRR.** Sont illustrés les principaux membres des protéines NBS-LRR, avec leurs caractéristiques structurales.

Tiré de : Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. (2003). Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.*, **5(9)**:581-92.

## ii) RIG-I

L'ARN hélicase contenant une boîte DexD/H nommée *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) a récemment été identifiée pour son rôle dans l'induction de l'immunité innée en réponse à l'ARN double-brin (dsRNA) viral, un intermédiaire de la réplication virale dont il sera question en détails plus loin (268). Chez des cellules montrant une grande permissivité à la réplication du génome du virus de l'hépatite C humain (HCV), Sumpter et ses collègues ont montré qu'il y avait une mutation dans le gène inducible par les interférons, codant pour RIG-I (235). De plus, il a été démontré que le HCV a développé au cours de l'évolution une protéase nommée NS3/4A capable de neutraliser l'action de RIG-I, et d'ainsi limiter la production d'IFN de type I, permettant une évasion du système immunitaire et une infection persistante (67). RIG-I possède donc un rôle important dans la protection contre le HCV, mais également contre le virus de Sendai (SeV) et le *vesicular stomatitis virus* (VSV) (235).

Par un mécanisme dépendant de l'ATP, les ARN hélicases sont capables de dérouler le dsRNA. La protéine cytoplasmique RIG-I est capable d'interagir avec le dsRNA et, via son domaine CARD en N-terminal, elle transmettrait un signal menant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3 et à la production d'interférons de type I (voir plus bas)(268). Il ne s'agit pas à proprement parler d'un *pattern recognition receptor*, mais puisque RIG-I reconnaît une structure conservée entre plusieurs espèces, le dsRNA, elle a ici été classée parmi ce groupe.

## **B) Récepteurs membranaires**

### **i) Récepteur du complément de type 3**

Le récepteur *Type 3 Complement Receptor* (CR3, Mac-1, CD18/CD11b) est une intégrine  $\beta$ 2, récepteur pour le fragment iC3b du complément, dont la liaison facilite la phagocytose/dégranulation, ainsi qu'une molécule d'adhésion facilitant la diapédèse des leucocytes, dont il facilite le recrutement au site d'inflammation, à travers l'endothélium (208). Il est capable de former des complexes avec les récepteurs ancrés au glycosylphosphatidylinositol (GPI) comme Fc  $\gamma$ RIIb (CD16b) ou uPAR (CD87), et de transmettre un signal transmembranaire menant à l'adhésion au cytosquelette ou à la phagocytose et à la dégranulation (208).

### **ii) Récepteurs scavengers**

Les récepteurs *scavenger* (*to scavenge* : faire les poubelles) sont une appellation large pour définir une grande variété de récepteurs membranaires non-apparentés, exprimés sur les macrophages et certaines cellules endothéliales et possédant une spécificité pour les ligands polyanioniques (84). Ils sont responsables de l'accumulation d'esters de cholestérol dans les macrophages, de la formation de gouttelettes de lipides et, ultimement, de l'athérosclérose (68). Les macrophages expriment au moins 6 différents récepteurs reconnaissant les formes modifiées de LDL (86). Les récepteurs scavenger se subdivisent en classe A (SR-A), type I et II, glycoprotéines transmembranaires trimériques (196), tel MARCO (84), et en classe B (famille CD36 et CD68) (68). Une fonction bien connue d'un SR-A est la



phagocytose de thymocytes apoptotiques et de *Neisseria meningitidis* non-opsonisée (196). Un exemple de SR-B est le récepteur SR-B1, de la superfamille des CD36, qui lie fortement le HDL mais aussi les LDL natifs, acétylés ou oxydés (68). Plusieurs récepteurs *scavenger* lient les bactéries *in vivo* : SR-A, MARCO, LOX-1 et CXCL16 (86), et ont, avec les récepteurs du complément, une fonction importante dans l'internalisation des pathogènes par les APC (113).

### **iii) Dectine-1**

La Dectine-1 est un récepteur de type lectine, exprimé faiblement à la surface des macrophages et fortement à la surface des DC (72), et capable de reconnaître les  $\beta$ -Glucans non-opsoniques, comme le zymosan, une particule issue de la levure et composée majoritairement de polysaccharides (24). Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II, de 244 acides aminés, portant en C-terminal un motif de reconnaissance des polysaccharides (11). Le zymosan, son ligand le plus important, active les cellules du système réticulo-endothélial, et confère une résistance à certaines tumeurs et infections (24). La dectine-1 interagit de plus avec les lymphocytes T, indépendamment des  $\beta$ -Glucans (84).

### **iv) Récepteur du mannose**

Le récepteur du mannose et autres lectines de type C sont exprimés par les macrophages, les DC, et quelques cellules endothéliales (84). La famille est formée de quatre glycoprotéines, le récepteur du mannose, le récepteur M-type des phospholipases sécrétoires A(2) (PLA(2)R), DEC-205/gp200-MR6 et Endo180/uPARAP, chacune étant un récepteur transmembranaire de type I, avec un domaine N-terminal riche en cystéine, un domaine fibronectine de type II et de 8 à 10 domaines *lectin-like* (59). Les ligands du récepteur du mannose sont les mannoses, fucoses ou GlcNAc retrouvés à la surface de bactéries, de mycètes, de parasites et de cellules infectées par des virus (84). Cette famille de PRR est impliquée dans des fonctions complexes reliées à la « clairance », l'homéostasie, l'immunomodulation et la défense de l'hôte (84). De plus, le récepteur du mannose

est capable de reconnaître des autoantigènes et des molécules potentiellement dangereuses issues du soi, et d'en assurer la disposition (84).

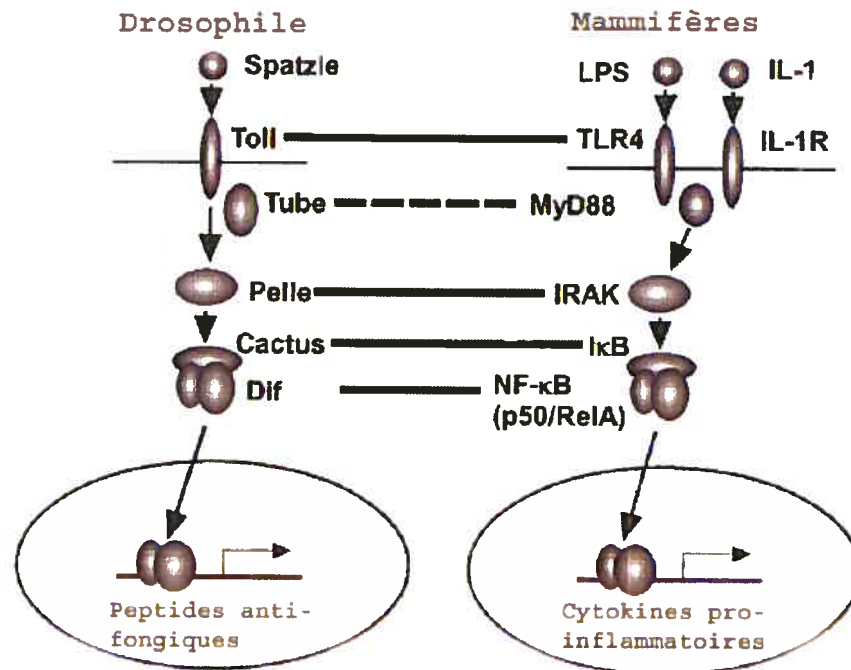
#### **v) Toll-like receptors**

Finalement, les *Toll-like receptors*, découverts en 1997 (172), codés par un homologues du gène *toll* de *Drosophila melanogaster*, dont le produit a un rôle dans l'embryogénèse (8), seront abordés en détail dans la prochaine section.

#### **2.2.1) Les Toll-like receptors**

##### **2.2.1.1) Toll chez *Drosophila melanogaster***

Le nom Toll-like fait référence au gène *toll* de *Drosophila melanogaster*, impliqué dans la polarisation dorso-ventrale de l'embryon (8, 99) : l'absence d'expression de ce gène par la mère en cause la dorsalisation complète (76). Chez cet insecte, le gène code pour le récepteur transmembranaire Toll, qui, suite à la reconnaissance probable du facteur Spätzle, recrute l'adaptateur Tube afin d'activer la sérine/thréonine kinase cytoplasmique Pelle (238). Ceci induit la dégradation de Cactus, inhibiteur des facteurs de transcription Dorsal, chez la larve, et DIF (*Dorsal-related immunity factor*) chez l'adulte, apparentés à NF- $\kappa$ B (116). Dorsal ou DIF peuvent alors transloquer au noyau et activer la transcription de gènes impliqués dans l'embryogénèse (238). La similarité avec le mécanisme d'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, décrit plus loin, est frappante et met en évidence une origine évolutive commune (116) (figure 3).



**Figure 3 : Comparaison entre la voie de signalisation associée au Toll de la drosophile et à celle reliée aux récepteurs TLR et IL-1R des mammifères, médiée par NF-κB.** Le ligand de Toll est Spatzle, alors que l'IL-1R lie l'IL-1 et les TLR des PAMP, tels le LPS. La ligne pointillée en Tube et MyD88 signifie une moins grande homologie de séquence qu'entre les autres facteurs. Modifié à partir de : Kaisho T, Akira S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.*, **22**(2):78-83.

En se basant sur cette ressemblance, une équipe a montré un nouveau rôle du récepteur Toll de la drosophile dans la lutte contre les mycètes pathogènes, en régulant l'expression du gène de la drosomycine, un antifongique peptidique (150) produit dans le corps gras, équivalent du foie chez la mouche (115). Une mutation du gène *toll* induit chez la drosophile une grande vulnérabilité à l'infection fongique. Il semblerait que le récepteur Toll soit responsable, chez cet insecte, outre l'embryogénèse, de la lutte contre les infections fongiques et les bactéries Gram positif ; la défense contre les bactéries Gram négatif serait prise en charge par la voie IMD (151). La protéine de 25kDa IMD (*immune deficiency*), pourvue d'un domaine *Death*, est un homologue de la protéine RIP (*TNF-receptor interacting protein*), retrouvée chez les mammifères (75), et depuis identifiée pour son rôle dans la signalisation du système immunitaire inné (174).

### 2.2.1.2) Découverte des Toll-like receptors

La découverte du rôle immunitaire de Toll chez la drosophile, en plus de sa ressemblance avec le récepteur 1 de l'interleukine 1 de l'humain (IL-1R1) (57), ont stimulé la recherche d'un système homologue chez les mammifères. Celui-ci fut trouvé en 1997, lorsque l'équipe de Medzhitov clonât et caractérisât, chez l'humain, une protéine transmembranaire, homologue de Toll et pour cela nommée Toll-like receptor, dont un mutant constitutivement actif était capable d'activer la voie NF- $\kappa$ B (172). Peu après, Poltorak et ses collègues ont montré qu'une mutation dans le gène *tlr4*, chez des souris C3H/HeJ et C57BL/10ScCr les rendait résistantes aux endotoxines, mais très sensibles aux infections par des bactéries Gram négatif (200). Un lien a ainsi été établi entre le TLR4 et le récepteur longtemps recherché du lipopolysaccharide (LPS). Peu à peu, d'autres TLR furent découverts (207), dont le nombre atteint aujourd'hui 10, plus un onzième chez la souris (271).

Les TLR reconnaissent des structures nommées PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*), retrouvées chez les pathogènes, mais absentes chez les mammifères (239). Alors que l'antigène typiquement reconnu par un anticorps est une structure tridimensionnelle bien précise, par exemple un petit fragment de protéine, le PAMP est une structure conservée chez différents pathogènes, comme le flagelle bactérien (100) ou l'ARN double-brin viral (dsRNA)(6). Un TLR donné pourra donc reconnaître le même PAMP issu de plusieurs espèces, alors qu'un anticorps est, dans la majorité des cas, si spécifique à son antigène, qu'une divergence d'un seul acide aminé, ou une légère modification de la structure tridimensionnelle, entre deux protéines homologues provenant d'espèces différentes suffira à abroger sa liaison (5).

Suite à la liaison de leurs ligands, les TLR sont capables d'activer, entre autres, les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3; les voies menant à l'activation de ceux-ci seront traitées en détail plus loin. En plus d'induire une réponse immunitaire pro-inflammatoire, par la transcription de gènes spécifiques, les TLR participent à la phagocytose de bactéries. En effet, la liaison de ligands aux TLR induit la production par les macrophages de récepteurs *scavenger*, tels SR-A, LOX-1 et MARCO, par un mécanisme conservé entre la souris et l'humain, impliquant

l'interleukine-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) et p38 (56). Ce phénomène est induit le plus fortement par TLR9, et le plus faiblement par TLR3.

### **2.2.1.3) Structure, classification et ligands des TLR**

Les TLR ont tous en commun un domaine extracellulaire composé de répétitions riches en leucine (LRR) (207), un domaine transmembranaire, et un domaine cytosolique nommé *Toll-Interleukin-1 Receptor domain* (TIR) (57). Le domaine extracellulaire est responsable de la reconnaissance des ligands, alors que le domaine cytosolique sert au recrutement des molécules impliquées dans la signalisation intracellulaire.

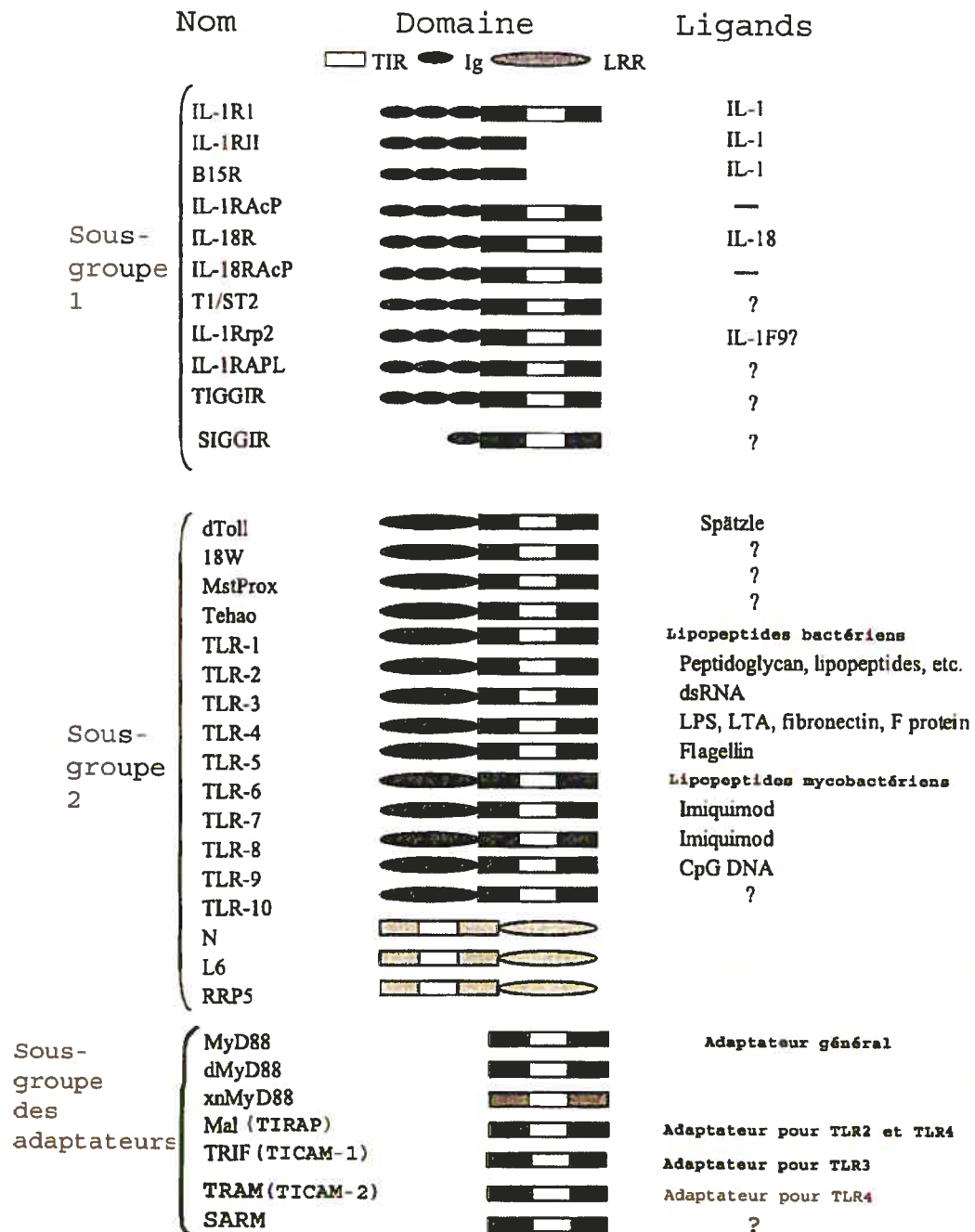
On classe les TLR dans la superfamille de protéines nommée l'IL-1R/TLR superfamily, dans laquelle sont inclus des récepteurs transmembranaires et des adaptateurs intracellulaires (57), tous caractérisés par la présence d'un domaine TIR (figure 4).

Le sous-groupe 1 contient les récepteurs apparentés à celui de l'IL-1R1, comme IL-18R et TIGGIR : bien qu'ils partagent avec les TLR le domaine TIR cytosolique, leur domaine extracellulaire est cependant formé de modules immunoglobulin (Ig) (57).

Le sous-groupe 2 contient les TLR, en plus de 9 protéines présentes chez la drosophile, dont Toll, 18-Wheeler, Mstprox et Tehao (57). Dans ce groupe se trouvent également le produit du gène de résistance au virus de la mosaïque du tabac, N (257), le produit du gène de résistance RRP5 de *Arabidopsis thaliana*, contre la moisissure pathogène *Peronospora parasitica* (192), et enfin le produit du gène de résistance contre *Melampsora lini*, L6, chez le lin (148). On trouve donc dans ce sous-groupe des protéines issues autant de mammifères, que d'insectes ou de plantes, ce qui montre la conservation inter-espèces de cette classe de récepteurs et donc leur importance et leur ancienneté. Ainsi, les TLR humains sont plus apparentés au Toll de *drosophila melanogaster* qu'au IL-1R1 humain (207).

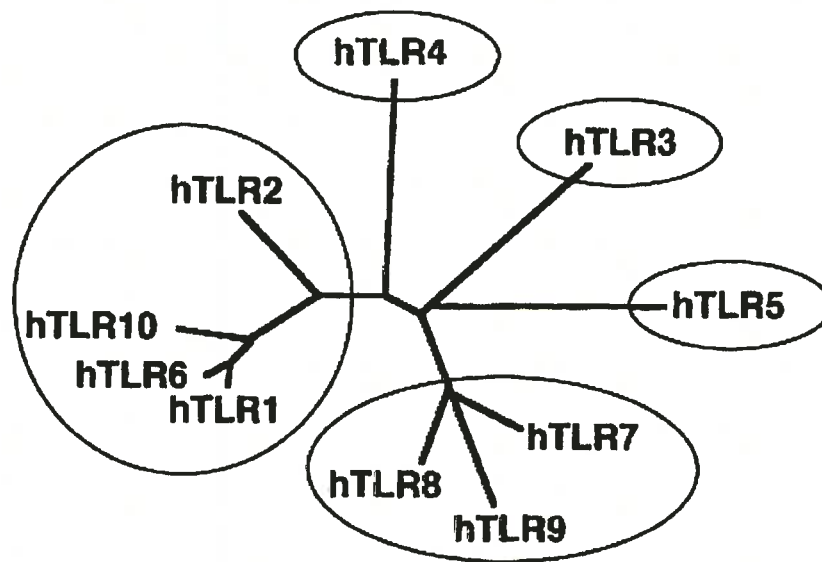
Finalement, le dernier sous-groupe contient une série de protéines cytosoliques qui servent comment adaptateurs dans la signalisation intracellulaire, y compris dans celle reliée aux TLR. Ces protéines, par exemple *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), ou *TIR-domain containing adaptor inducing*

*IFN $\beta$*  (TRIF), ne comprennent que le domaine intracellulaire porteur du TIR (57) (figure 4).



**Figure 4 : Membres de la superfamille *interleukin-1 receptor/Toll-like receptor*.** Modifié à partir de : Dunne A, O'Neill LA. (2003). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE*, (171):re3.

La phylogénie permet de classer les TLR humain en 5 grandes familles : TLR3, TLR4 et TLR5 forment chacun une famille ; TLR1, TLR2, TLR6 et TLR10 en forment une quatrième et TLR 7, TLR8 et TLR9 en forme une cinquième (figure 5) (238). TLR1 et TLR6 sont les plus proches évolutivement, probablement le produit de la duplication d'un gène, avec 69,3% d'identité de séquence d'acides aminés (238).



**Figure 5: Arbre phylogénique des Toll-like receptors humain.**

Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*, 21:335-76.

#### **a) TLR1, TLR2 et TLR6 :**

Les ligands de TLR2 connus sont les lipoprotéines, les peptidoglycanes et l'acide lipotéichoïque des bactéries à Gram<sup>+</sup>, le lipoarabinomannane des mycobactéries, les ancres glycosylphosphatidylinositol (GPI) de *Trypanosoma cruzi*, le zymosan issus de mycètes et les glycolipides de *Treponema maltophilum*, ainsi que certains types de LPS (241). De plus l'hémagglutinine du virus de Measles induit la signalisation via TLR2 (20).

TLR2 forme des dimères avec TLR1 (244) et TLR6 (243), ce qui lui permet de faire la distinction entre lipoprotéines diacylées ou triacylées. En effet, des macrophages issus de souris TLR1<sup>-/-</sup> perdent la réponse aux lipopeptides triacylés,

mais conservent celle aux lipopeptides diacylés (244), alors que des macrophages issus de souris TLR6<sup>-/-</sup> montrent un comportement inverse (243). De plus, TLR2 interagirait d'une quelconque façon avec le PRR dectine-1, mentionné plus haut, qui aurait sur lui un effet synergique dans l'induction du facteur de transcription NF- $\kappa$ B par des particules contenant des  $\beta$ -glucans et dans la production de IL-12 et de TNF $\alpha$  par des macrophages et des DC (72). Finalement, le PRR CD36 serait impliqué dans la reconnaissance de diacylglycérides microbiens, et participerait donc à la reconnaissance de quelques ligands associés à TLR2 (114). Ainsi, la mutation rendant non fonctionnel CD36 induit un phénotype immunodéficient, où des macrophages sont insensibles à l'acide lipotéichoïque et à l'énantiomère R du lipopeptide bactérien diacylé MALP-2, et où des souris homozygotes sont hypersensibles à l'infection par *Staphylococcus aureus* (114).

Enfin, TLR2 est exprimé dans le cerveau, le cœur, les muscles et les poumons (57), TLR1 est exprimé de façon ubiquitaire et très forte (207) sur tous les leucocytes, incluant les monocytes, les leucocytes polymorphonucléaires, les lymphocytes T et B et les cellules NK (178), alors que TLR6 est exprimé dans le rate, le thymus, les ovaires et les poumons (242), sur une variété de types cellulaires.

#### **b) TLR 5 :**

TLR5, qui ne semble pas dimériser, reconnaît la flagelline du flagelle bactérien, provenant indifféremment de bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> (100). Des études de délétion et de mutagenèse ont permis de cibler le site précis d'interaction entre TLR5 et le flagelle. Il s'agit de 13 acides aminés impliqués dans les interactions intermoléculaires des protofilaments du flagelle (228). Ce TLR est exprimé surtout dans les ovaires et sur les monocytes (57).

#### **c) TLR7 et TLR8 :**

Jusqu'à récemment, on ne connaissait que des ligands synthétiques pour TLR7, exprimé chez les DC plasmacytoïdes (PDC) (57), et TLR8. En effet, TLR7 et TLR8 humains lient les imidazoquinolines, dont un membre, l'imiquimod, sert à traiter les verrues génitales (241). On ne connaît pas bien le mécanisme d'action de



l'imiquimod, mais il semblerait qu'il active les cellules mononucléaires périphériques à produire de l'IFN- $\alpha$ , et les macrophages à produire les IL-1, IL-6 et IL-8, ainsi que du TNF- $\alpha$  (139). Chez la souris, TLR7 reconnaît en plus l'ioxoribine, possédant des activités anti-tumorales et anti-virales (241). Les TLR ne reconnaissent donc pas uniquement les composants microbiens, mais aussi des composés synthétiques utilisés en clinique : un *screening* des composés activant les TLR pourrait donc avoir d'utiles applications cliniques (238).

Il a récemment été montré que TLR7 et TLR8 reconnaissent des séquences riches en GU d'ARN simple-brin (ssRNA) issus du virus d'immunodéficience humaine (HIV1), ce qui menait à l'activation de DC et de macrophages (103). Ceci démontrait un potentiel immunostimulant jusqu'alors inconnu au ssRNA. De plus, le ssRNA du virus de l'influenza et du Vesicular Stomatitis Virus (VSV) stimule TLR7 et induit la production de cytokines inflammatoires uniquement lorsque la voie endocytaire est intacte (50, 162). Ceci suggère une localisation endosomiale de TLR 7, et peut-être TLR8. Or, le ssRNA endogène, contrairement au ssRNA viral, n'atteint normalement pas les endosomes : TLR7 et TLR8 distingueraient ainsi entre le ssRNA d'origine endogène et d'origine virale grâce à leur localisation subcellulaire (50).

Il est finalement intéressant de noter que TLR1, TLR2 et TLR 6, cousins évolutifs, sont spécialisés dans la reconnaissance des lipoprotéines, et que TLR7 et TLR8, membres d'une autre famille, se lient surtout aux acides nucléiques.

#### **d) TLR9 :**

Ce TLR, exprimé chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes (PDC), mais pas myéloïdes (MDC) (255), est hautement homologue des TLR7 et TLR8 (238). Il reconnaît l'ADN CpG non-méthylé (105) en interagissant directement avec lui. Le motif nucléotidique optimal reconnu, chez l'humain, est GTCGTT (17).

Rare chez les mammifères, et en général méthylé sur les résidus cystéine, le motif CpG est en revanche fréquent et non méthylé chez les bactéries. La liaison de ces acides nucléiques à TLR9 induit une forte réponse inflammatoire, de type  $T_H1$  (105). Il existe deux types d'ADN CpG: le type B/K conventionnel, induisant fortement les cytokines proinflammatoires telles l'IL-12 et le TNF- $\alpha$ , et le type A/D

modifié, ayant un fort effet positif sur la production d'IFN- $\alpha$  par les PDC, mais peu d'effet sur la production d'IL-12 (241). Les deux groupes d'ADN CpG diffèrent par leur séquence nucléotidiques et par le fait que le type A/D soit plus long et présente des extrémités cohésives complémentaires (250). Ils sont tous deux reconnus par TLR9 (106).

Le virus de l'herpès simplex (HSV), contrairement aux plus petits virus, contient une forte quantité d'ADN CpG. Il a été montré que des PDC produisaient de l'IFN- $\alpha$  en réponse au HSV vivant, inactivé, ou simplement à l'ADN viral, conditionnellement à la présence de TLR9 et de voies endocytiques intactes (161). Il existe cependant aussi une voie de réponse à HSV-1 indépendante de TLR9 (111).

Ainsi, TLR9 confère une protection contre les envahisseurs bactériens ou viraux et résiderait dans des vésicules endocytiques (161), ce qui est supporté par le fait que la liaison de TLR9 avec l'ADN CpG est favorisée aux pH acides retrouvés dans les endosomes et les lysosomes (210). Cette reconnaissance virale semble confirmée par la nécessité, chez la souris, de la présence de TLR9, en conjonction avec TLR3, pour une lutte efficace contre le cytomégalovirus murin (MCMV) (236).

#### **e) TLR10 :**

Le gène codant pour TLR10 est situé sur un locus partageant ceux codant pour TLR1 et TLR6. Il a été montré qu'il était capable d'homodimériser et d'hétérodimériser avec TLR1 et TLR2 et qu'il était fonctionnel (98). Il est exprimé d'une façon très restreinte, chez les lymphocytes B et les PDC (98). Cependant, il reste toujours un récepteur orphelin et d'autres études sont nécessaires afin de lui déterminer un rôle précis.

#### **f) TLR4 :**

TLR4 fut le premier TLR à être découvert (172), pour son rôle dans la reconnaissance du LPS bactérien (200), qui produit un état proinflammatoire vigoureux et généralisé chez l'organisme infecté (203). De plus, TLR4 lie l'acide lipoteichoïque (LTA), le taxol, un terpène issu de l'If occidental (*Taxus brevifolia*), ainsi que les ligands endogènes HSP60, HSP70, le domaine A des fibronectines,

héparan sulfate et fibrinogènes, mais à très fortes doses (241). Il a été proposé que TLR4 soit responsable de la reconnaissance du LPS de forme « conique » (e.g. *E.coli*), que le LPS de forme plus « cylindrique » (e.g. *Porphyromonas gingivalis*) soit reconnu par TLR2 et active un différent groupe de cytokines, et que le LPS strictement cylindrique (e.g. *Rhodobacter spheroides*) soit incapable d'induire la production de cytokines (183).

Le LPS bactérien est probablement reconnu en premier lieu par une protéine de phase aigüe, produite dans le foie, nommée LPS-Binding protein (LBP) (218). Celle-ci est capable de former de forts complexes avec le lipide A du LPS, libre ou lié à des bactéries. Le rôle de LBP circulante serait de faciliter la liaison du LPS à CD14, qui est une protéine de 55kDa reconnue depuis longtemps comme un co-récepteur essentiel à la réponse cellulaire au LPS (90).

CD14 se retrouve sous deux formes : libre (sCD14) (248) ou ancrée par GPI à la surface des monocytes, macrophages ou leucocytes polymorphonucléaires (mCD14) (189). La forme libre sert à transporter le LPS vers des cellules dépourvues de mCD14, comme les cellules épithéliales ou endothéliales. CD14 aurait donc comme but de lier le LPS et de le présenter au récepteur (189). Le fait que des souris dépourvues de CD14 soient capables, suite à la stimulation au LPS, de produire quand même des protéines de phase aiguë, laisse penser qu'il y aurait peut-être un moyen pour les cellules de se passer de CD14 pour charger le LPS (102).

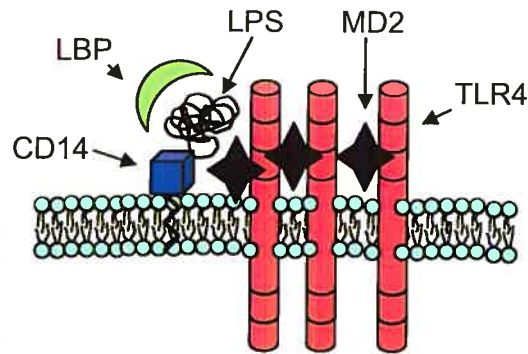
Une troisième molécule impliquée dans la reconnaissance du LPS est MD2. Un mutant ponctuel MD2 exprimé avec TLR4 abolit la réponse au LPS, alors que l'introduction de MD2 sauvage renverse ce phénotype non-répondant (216). Lorsque co-exprimés, TLR4 et MD2, qui forment des polymères, s'associent dans le réticulum endoplasmique/cis-Golgi, l'excès de MD2 étant excrété dans le milieu (251). De très faibles quantités de MD2 sont nécessaires à permettre la réponse au LPS. Son rôle précis est de faciliter la liaison de TLR4 au LPS et la formation de complexes stables de plusieurs TLR4, détectés au microscope électronique à balayage, nommés réceptosomes (252) (figure 6). Il a récemment été montré que CD14 favorise grandement la formation du complexe LPS/TLR4/MD-2 en aidant le chargement de LPS sur TLR4/MD2, mais pas l'interaction directe avec le complexe (3).

La stimulation de TLR4 induit ultimement la production d'une variété de cytokines proinflammatoires, comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ , ainsi que d'autres protéines proinflammatoires, telle la *NO synthase* inducible (iNOS) (189).

On retrouve de grandes quantités de TLR4 dans le placenta et les leucocytes périphériques du sang (57), ainsi que sur les adipocytes 3T3-L1 de souris (157) et les cellules musculaires lisses vasculaires (214). Il est de plus connu que TLR4 est exprimé sur les macrophages présents dans les plaques athérosclérotiques riches en lipides, et que son expression est augmentée par le oxLDL (261). L'expression de TLR4 sur les monocytes et les leucocytes polymorphonucléaires est induite par le LPS et les cytokines proinflammatoires, alors que l'IL-10 annule cet effet (178).

Une propriété intéressante du LPS est le blocage, d'une manière ne dépendant pas uniquement de TLR4, de la différenciation de monocytes inflammatoires en DC, au site de la reconnaissance du PAMP (209). Les mécanismes précis déterminant la différenciation des monocytes soit en macrophages, soit en DC sont encore obscurs, mais on sait qu'environ 25% deviendront des DC et migreront aux ganglions lymphatiques afin de présenter les antigènes, alors que le reste deviendra des macrophages résidants (204). Il semblerait que l'inhibition de la différenciation en DC et de la migration subséquente aux ganglions lymphatiques, chez ces 25% de monocytes, bien qu'elle bloque l'induction du système immunitaire adaptatif, ait pour but d'empêcher l'évasion des bactéries intracellulaires hors du site d'inflammation, en utilisant les DC migrant (209).

Un intérêt particulier lié aux recherches sur TLR4 vient du fait qu'il n'existe jusqu'à maintenant aucune approche thérapeutique efficace contre le choc septique induit par le LPS, causant plusieurs morts annuellement (189).



**Figure 6: Réceptosome TLR4.** TLR4, aidé de MD2, forme des complexes de plusieurs récepteurs afin de faciliter la liaison du LPS/LBP, dont le chargement est favorisé par CD14 (voir texte).

### g) TLR3 :

TLR3, phylogénétiquement éloigné des autres TLR, serait cependant plus similaire aux TLR7, TLR8 et TLR9, responsables de la reconnaissance d'acides nucléiques étrangers au soi (170). Suite à sa stimulation par l'ARN double-brin (dsRNA), TLR3 active les facteurs de transcription IRF-3 et NF- $\kappa$ B (voir plus bas), induisant entre autres la production d'interférons de type I (6) et la maturation des DC (238). Les interférons- $\beta$  viennent en retour augmenter la transcription du gène *tlr3*, et la quantité d'ARNm de TLR3 (104). Ce récepteur est une protéine formée de 904 acides aminés (207), spécialisée dans la reconnaissance de l'invasion virale, qui possède un domaine extracellulaire de 23 répétitions riches en leucine (LRR) et des régions riches en cystéines en C-terminal et N-terminal.

L'ARN double-brin, le principal ligand connu de TLR3, est soit un intermédiaire nécessaire dans la synthèse d'ARN viral, soit un produit secondaire de la transcription symétrique du génome de virus à ADN (125, 238), c'est-à-dire que chaque brin utilise l'autre comme amorce à la réplication. L'analogue synthétique, plus stable, de l'ARN double-brin, le poly(I :C) est aussi un inducteur puissant de la production d'IFN (170). En réponse à son ligand, TLR3 induit rapidement, via les facteurs de transcription IRF-3 et NF- $\kappa$ B, les gènes de l'IFN $\beta$  et des cytokines RANTES et IP-10, comme le fait TLR4 en réponse au LPS (55). TLR3 a donc un rôle complémentaire à celui joué par RIG-I (voir plus haut) (67).

En plus de détecter l'ARN viral, TLR3 aurait un rôle à jouer dans la réponse immunitaire contre les cellules nécrotiques : il a été montré qu'il induisait une réponse suite à la liaison de l'ARNm associé à ou relâché par les cellules nécrotiques (136). Comme l'inhibiteur de la kinase PKR, le 2-aminopurine, n'induit pas une perte d'activation de rapporteurs luciférase (promoteurs de gènes induits par TLR3 couplés au gène de la luciférase chimioluminescente, comme ELAM, qui répond à l'activation de NF- $\kappa$ B) suite à la stimulation par l'ARNm, il semblerait que cette kinase ne soit pas impliquée dans ce mécanisme. (136). En effet, la kinase PKR a préalablement été suggérée comme ayant un rôle, encore ambigu, dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B suite à la stimulation de cellules au poly(I :C) (130).

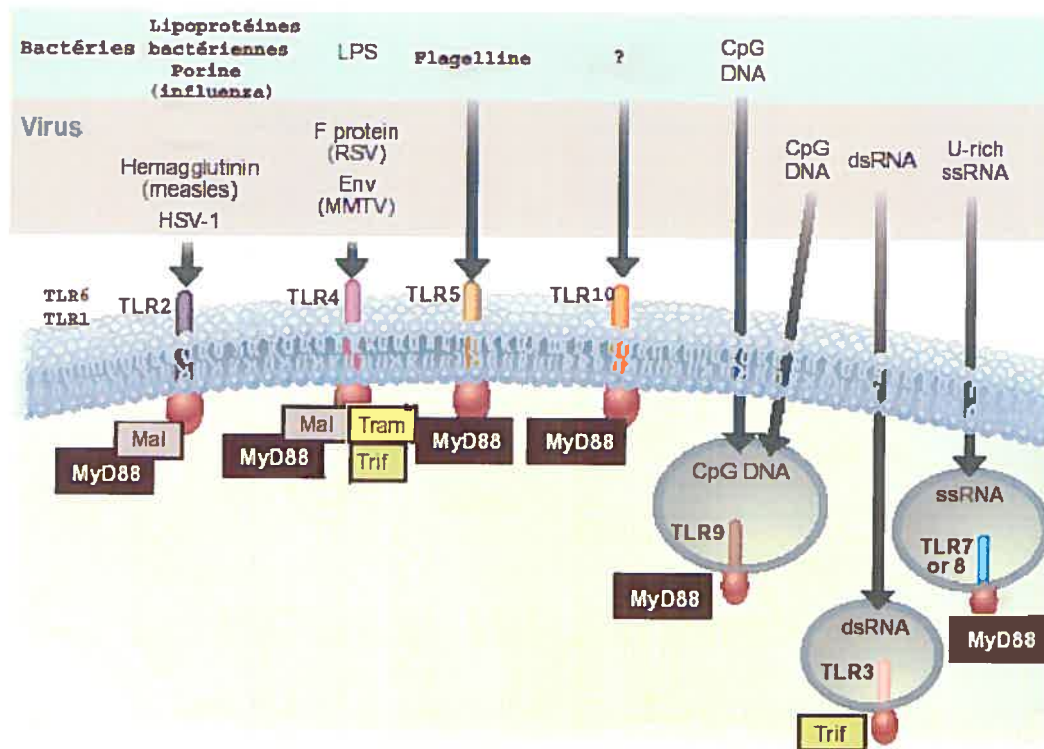
TLR3 se retrouve dans le cerveau, le cœur, les muscles, les reins et fortement dans le pancréas et le placenta (57). On le retrouve également sur les DC, les cellules épithéliales intestinales, mais pas sur les monocytes, les leucocytes polymorphonucléaires, les lymphocytes T ou B, ni sur les cellules NK (170). Contrairement à leurs homologues humains, les fibroblastes embryonnaires de souris ne produisent pas d'IFN de type I en réponse au poly(I :C), ce qui suggérerait une expression différente de TLR3 d'une espèce à l'autre (170).

TLR3 est exprimé, du moins, chez les cellules dendritiques immatures (iDC), dans des vésicules non identifiées, appartenant au système de trafic endocytaire, nommées corps multivésiculaires (MVB), alors que chez les fibroblastes et les cellules épithéliales, on le retrouve à la fois à l'intérieur et sur la surface cellulaire (169). Il a récemment été montré qu'une région du domaine cytoplasmique de TLR3, nommée *linker region*, sise entre les résidus 730 et 755, était responsable de la localisation vésiculaire de TLR3 chez les iDC (70). La nécessité de cette région pour la transduction d'un signal suite à la stimulation de TLR3 par son ligand a de plus été montrée. L'induction de gènes en réponse à la stimulation de TLR3 étant bloquée par des inhibiteurs des tyrosines kinases, une équipe s'est intéressée à l'importance des 5 tyrosines présentes dans le domaine cytoplasmique de TLR3, et a montré leur nécessité, en particulier la Tyr 759 (212), ce qui laisse penser que TLR3 est phosphorylé. En effet, le rôle de la phosphorylation de TLR3 a été confirmé pour l'activation de la kinase TBK-1, menant à l'activation d'IRF-3, ainsi que pour le

recrutement de la PI3 kinase, qui, via la kinases en aval Akt, serait nécessaire à la phosphorylation et à l'activation complète de IRF-3 (213).

TLR3 ne serait cependant pas le seul acteur impliqué dans la réponse au dsRNA : des souris déficientes en TLR3 ne montrent qu'un défaut partiel dans leur réaction au dsRNA, et l'introduction de poly(I:C) dans le cytoplasme de DC induit la production d'IFN de type I selon un mécanisme partiellement dépendant de la protéine kinase dépendante au dsRNA (PKR) (241). Il convient également de mentionner la protéine RIG-I, dont le rôle important dans la lutte antivirale a été montré (268).

Parmi tous les TLR, TLR3, humain ou murin, est le seul à ne pas partager une proline dans sa queue cytoplasmique (10). Il a été montré que ce résidu était nécessaire à la signalisation par les autres TLR (133, 4). La proline étant un acide aminé à la structure particulière, responsable de contraintes conformationnelles chez les protéines, sa présence modifie souvent fortement la structure secondaire du polypeptide. Les souris mutantes C3H/HeJ, ne répondant pas au LPS ont justement une mutation dans leur gène codant pour TLR4 de cette proline en histidine (P712H) (203), tout comme des dominants négatifs TLR2 (P681H), TLR1 (P678H) et TLR6 (P691H) (91). L'absence de cet acide aminé chez TLR3 lui confère une singularité qui se reflète dans les molécules de signalisation adaptatrices y étant recrutées, comme il sera décrit plus loin.



**Figure 7: TLR et leurs ligands.** Les TLR sont des récepteurs transmembranaires capables de reconnaître des patrons associés à des pathogènes (PAMPS). Les ligands principaux, viraux et bactériens, étant reconnus par eux sont illustrés. Leur queue cytoplasmique contient un domaine TIR chargé de recruter les adaptateurs menant à la transduction du signal (voir texte).

Modifié à partir de : O'Neill LA. (2004). Immunology. After the toll rush. *Science*, 303(5663):1481-2.

#### 2.2.1.4) Voies de signalisation liées aux TLR

Dépourvus d'activité enzymatique intrinsèque, les *Toll-like receptors* doivent, pour induire la transcription de gènes impliqués dans la lutte anti-pathogènes, recruter des molécules de signalisation. La liaison de leurs ligands aux TLR induit, dans le cas de TLR1, TLR2 et TLR6, l'hétérodimérisation (243, 244), et dans le cas de TLR4, l'homopolymérisation (252). L'adaptateur *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), est capable de venir interagir avec le domaine TIR des TLR stimulés par leurs ligands (100). Parmi les TLR, TLR3 fait figure d'exception, en n'utilisant pas MyD88 pour transmettre un signal (131), alors que TLR2 et TLR4 requièrent l'adaptateur *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP), aussi nommé *MyD88 adaptor-like* (Mal), afin de recruter MyD88 (263). Les voies de signalisation induites



par les TLR et menant à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, IRF-3 et AP-1 sont donc aujourd'hui séparées en MyD88-dépendantes, menant principalement à la production de cytokines pro-inflammatoires, et MyD88-indépendantes, qui mène également et surtout à la production d'interférons de type I.

La capacité des TLR à induire une réponse immunitaire est donc étroitement liée à leur aptitude à activer principalement les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3. Ces deux protéines, dont les mécanismes d'action et les partenaires seront détaillés plus loin, sont capables, suite à leur liaison à l'ADN sur des sites spécifiques, d'induire la production de molécules impliquées dans la lutte anti pathogènes, par exemple

#### **a) Voie MyD88 dépendante**

MyD88 a été identifié à l'origine comme gène de réponse primaire à la différenciation myéloïde chez des cellules murines (160). Formée de 296 acides aminés, membre de la famille des adaptateurs de la superfamille IL-1R/TLR pour son domaine TIR en C-terminal (figure 4) (241), il possède un domaine *death* en N-terminal, qui a tôt fait supposer qu'il pourrait interagir avec d'autres protéines, possiblement des récepteurs membranaires (23). Les domaines TIR et *death* sont séparés par un court domaine intermédiaire (ID) (127). Via son domaine TIR, il interagit, suite à leur stimulation, avec les TLR1 et TLR5 à TLR10, afin de mener à la production de cytokines inflammatoires, telles le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6 (81) (figure 8). Les TLR2 et TLR4 requièrent TIRAP (Mal) afin de s'y associer (voir plus loin) et TLR3 n'y fait pas appel.

La transmission du signal, à la suite de MyD88 fait appel aux *IL-1 receptor-associated kinases* (IRAK). Ce groupe de sérine/thréonine kinases contient 4 membres connus, IRAK-1, IRAK-4, IRAK-2 et IRAK-M, les deux dernières étant catalytiquement inactives (240). Elles possèdent un domaine *death* en N-terminal, responsable de l'interaction avec MyD88, et un domaine kinase central (240) et sont des homologues de la kinase pelle de la drosophile (figure 3) (129). IRAK-4 vient donc interagir avec MyD88 et recrute puis phosphoryle sa cousine IRAK-1 (figure 8) (153).

Le membre de la famille des *tumor necrosis factor receptor-associated factors* TRAF6, une *RING domain ubiquitin ligase*, est ensuite recruté au complexe et activé par IRAK-1 (240). Autour de TRAF6 se forme alors un imposant complexe (240). Il a été montré, d'abord pour le récepteur de l'IL-1, que TRAF6 interagissait avec la MAPKK kinase TGF- $\beta$ -activated kinase 1 (TAK1), ce qui mène à sa phosphorylation et à son activation (184). Avant sa liaison à TRAF6, TAK1 forme déjà un complexe avec les deux *Tak1 binding proteins* TAB1 et TAB2 (129). L'interaction entre TAK1 et TRAF6/IRAK1 se fait près de la membrane, mais après dissociation des deux dernières molécules du récepteur (240). Par la suite, le complexe TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2 subit une translocation vers le cytosol, alors que IRAK1 est ubiquitinée et dégradée par un mécanisme impliquant le protéasome (129). Trois autres protéines viennent s'ajouter au complexe : l'*ubiquitin conjugating enzyme* Ubc13 et la *Ubc-like protein* Uev1A, ainsi qu'une protéine nouvellement découverte, TIFA (*TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain*) (58) catalysent la formation d'une chaîne de polyubiquitine sur TRAF6 et sa polymérisation, ce qui aurait pour effet de permettre l'activation du complexe des IKK (figure 8 et voir plus bas), étape suivante de la voie de signalisation (47), en plus des MAP kinases, telles JNK, menant à l'activation du facteur de transcription AP-1 (240).

La protéine *ecsit* (*evolutionary conserved intermediate in Toll pathways*) est également capable d'interagir avec TRAF6 et pourrait d'une quelconque façon moduler l'activité de MEKK3, mais son rôle exact n'est toujours pas clair (101).

Le rôle de TAK1 serait de phosphoryler et d'activer le complexe I $\kappa$ B kinase (IKK), formé des sous-unités catalytiques IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , ainsi que de la protéine d'échafaudage IKK $\gamma$ , ou NEMO (*NF- $\kappa$ B essential modulator*), qui viendrait à son tour phosphoryler I $\kappa$ B, une protéine dont le rôle est d'empêcher la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau (58). La phosphorylation de I $\kappa$ B induit son ubiquitination, par le complexe SCF (Skp1-Cullin1-Fbox)- $\beta$ TrCP E3, qui mène à sa dégradation et à la libération du dimère NF- $\kappa$ B, formé classiquement des sous-unités p50/p65 (101), qui peut alors subir une translocation au noyau et activer la transcription de gènes (58).

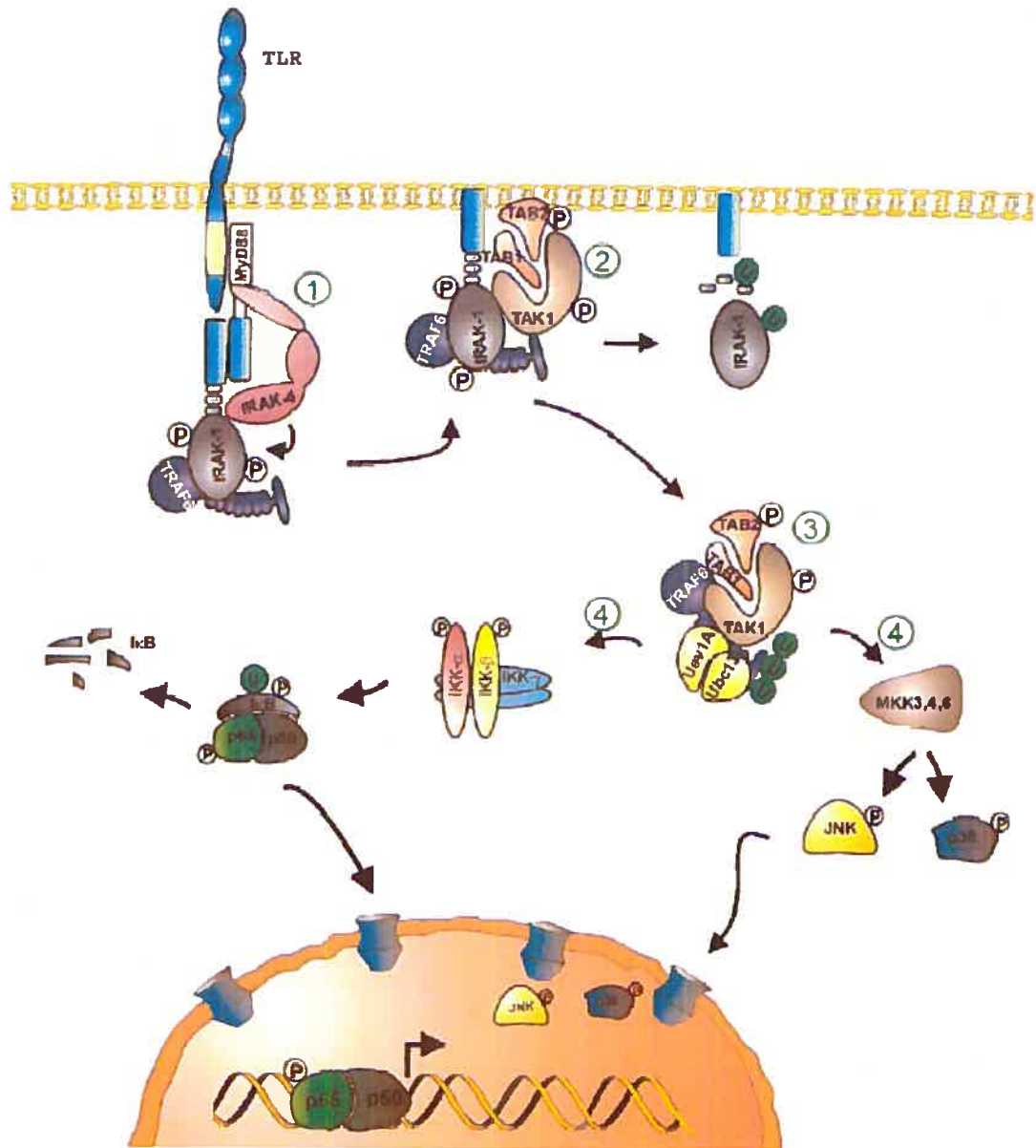
Vu la puissante réponse induit par l'activation de NF- $\kappa$ B, des mécanismes permettant l'adaptation cellulaire à une exposition prolongée aux ligands des TLR existent, par exemple, l'expression de IRAK-M, MyD88s et Tollip.

IRAK-M, dont l'expression est restreinte aux monocytes/macrophages, prévient la dissociation de IRAK-1 et IRAK-4 de MyD88 et l'interaction avec TRAF6 (144). Il s'agirait d'un mécanisme de protection contre le choc septique développé au cours de l'évolution.

Il existe un produit de l'épissage alternatif du gène codant pour MyD88, nommé MyD88s, dont la stimulation chronique de monocytes au LPS induit l'expression, qui est dépourvu du domaine intermédiaire (ID) (127). Contrairement à MyD88, il ne peut interagir avec IRAK-4 et induire sa phosphorylation. Sans IRAK-4 activée, IRAK-1 ne peut être phosphorylée ni ubiquitinée, empêchant ainsi l'activation de NF- $\kappa$ B en réponse au LPS ou à l'IL-1 (27). MyD88s aurait donc un rôle dans la tolérance aux endotoxines bactériennes, suite à une exposition prolongée. De plus, il a été montré que la surexpression de MyD88s n'empêchait pas l'activation de JNK et l'induction de gènes rapporteurs sous contrôle de AP-1 : il aurait donc un rôle de réglage fin de la réponse cellulaire au contact chronique de LPS (128).

Tollip, identifié à l'origine dans la signalisation reliée au récepteur de l'IL-1, s'associe à IRAK-1 (26) et IRAK-4, par lesquelles il est phosphorylé (269). En bloquant ensuite la phosphorylation et l'activité des IRAK, il agirait à titre de régulateur négatif à la production de médiateurs proinflammatoires durant l'infection et l'inflammation (269).

De plus, une récente étude montre que le *transforming growth factor*- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), qui est une cytokine anti-inflammatoire, induit la dégradation de MyD88 par un système impliquant l'ubiquitination et le protéasome : il s'agit d'un moyen pour réguler l'inflammation induite par la stimulation des TLR, mais qui touche exclusivement la voie dépendante de MyD88, donc pas la production d'interférons (179). Par exemple, des souris dépourvues de TGF- $\beta$  sont victimes d'inflammation sévère, éventuellement mortelle, lors d'infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

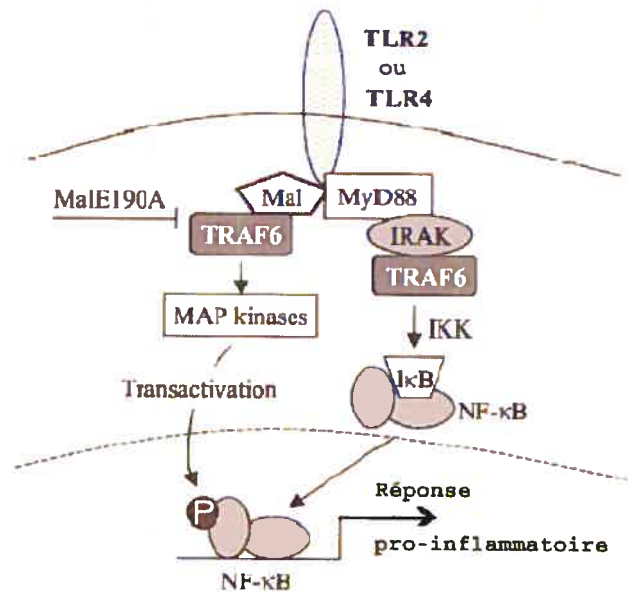


**Figure 8: Voie de signalisation dépendante de MyD88 reliée à la signalisation des TLR.** Modifié à partir de : Janssens S, Beyaert R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell.*, **11**(2):293-302.

Il a été montré que des cellules déficientes en MyD88 étaient capables d'activer NF-κB, les MAP kinase et d'induire la maturation des DC, suite à la stimulation de TLR4, mais pas TLR9, avec cependant une cinétique retardée (118). Horng et ses collègues ont alors erronément identifié l'adaptateur TIRAP (Mal), une protéine de 235 acides aminés, également membre de la famille des adaptateurs de la

superfamille IL-1R/TLR, mais dépourvu de domaine *death* en N-terminal (figure 4) (63), comme étant responsable, en aval de TLR4, d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 (118). Une seconde équipe a indépendamment identifié l'adaptateur TIRAP (Mal) et montré que son profil d'expression était similaire à celui de MyD88 et qu'il interagissait avec la kinase IRAK-2 : ils ont proposé que la signalisation par TLR4 impliquait un dimère TIRAP-MyD88, qui recruterait IRAK-2 (63). La génération de souris *knockout* pour le gène TIRAP a montré que cette protéine était impliquée, outre TLR4, dans la signalisation liée à TLR2 (et à ses codimères TLR1 et TLR6), mais pas à TLR5, TLR7 ni TLR9 (119, 263). De plus, il a été montré que TIRAP n'était pas relié à la voie de signalisation indépendante de MyD88.

Jusqu'à ce point, aucune distinction fonctionnelle n'existait entre Mal et MyD88 : en découvrant que Mal, mais pas MyD88, possédait un site potentiel d'interaction avec TRAF6 et qu'ils co-immunoprécipitaient, une équipe a finalement permis de la montrer (166). Ce motif (PPELRF) est nécessaire à Mal pour induire l'expression de gènes dépendant de NF- $\kappa$ B et un mutant dans cette région, MalE190A, en perd la capacité, même s'il est toujours capable de lier TRAF6 (166). Le fait que le mutant Mal ne permette plus l'expression de gènes dépendant de NF- $\kappa$ B, bien que NF- $\kappa$ B soit toujours relativement activé les laisse penser que Mal soit requis pour la transactivation médiée par sa sous-unité p65. Ils ont proposé le modèle de voie signalétique illustré à la figure 9.



**Figure 9: Rôles de TIRAP et MyD88 dans la signalisation reliée à TLR4 et TLR2.** Modifié à partir de : Mansell A, Brint E, Gould JA, O'Neill LA, Hertzog PJ. (2004). Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem.*, **279**(36):37227-30.

#### b) Voie MyD88 indépendante

Avant la découverte de TIRAP (Mal), il avait été observé que des souris déficientes en MyD88 ne produisaient plus de cytokines proinflammatoires en réponse au LPS, bien qu'elles continuassent, mais avec une cinétique retardée, à pouvoir activer NF-κB et JNK (140). Cette découverte a lancé plusieurs équipes sur la piste d'une voie de signalisation reliée aux TLR, indépendante de l'adaptateur MyD88. D'un autre côté, il a été montré que le LPS était le seul composant bactérien, en plus du dsRNA viral, à induire la production d'interféron-β (IFN-β) (226), ce qui suggérait une voie particulière liée aux récepteurs du dsRNA et du LPS. Enfin, TLR4, lorsque stimulé par le LPS, active le facteur de transcription IRF-3 et induit la transcription de gènes sous contrôle d'IRF-3, tels IP-10, même dans des cellules dépourvues de MyD88 et de TRAF6 (141).

Vers la même époque, Alexopoulou et ses collaborateurs ont identifié TLR3 comme étant un récepteur du dsRNA capable d'induire la production d'IFN de type I et d'activer NF-κB et les MAP kinases indépendamment de MyD88, en plus de

causer la maturation de DC (6). Or, il était connu que l'induction de la production d'IFN par les virus impliquait IRF-3 (267). La stimulation de TLR3 impliquerait donc une voie MyD88 indépendante semblable à celle utilisée par TLR4, qui est le seul TLR à signaler bilatéralement selon les deux voies. Celles-ci sont d'ailleurs requises à la toxicité intégrale émanant de la présence de LPS et leurs effets sont synergiques : la présence d'une seule des deux voies ne donne que 10% de la quantité de TNF produit chez des cellules possédant les deux (112).

À la lumière de ces résultats, il était possible de déterminer que la voie de signalisation liée aux TLR ne requérant pas MyD88 permettait:

- 1) une activation retardée de NF- $\kappa$ B et JNK (140),
- 2) une activation de IRF-3 suite à la stimulation de TLR4 (141)
- 3) suite à la stimulation de TLR3 par le dsRNA, une activation de NF- $\kappa$ B et des MAP kinases et une production d'IFN de type I (6), par un mécanisme impliquant IRF-3 (276).

Une ou des molécules capables de suppléer à MyD88 dans cette voie ont alors été recherchées. Le résultat fut la découverte de TRIF (TIR domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$ ) (262), aussi nommé TICAM-1 par l'autre équipe l'ayant découvert (187). Capable d'interagir directement avec TLR3, sa surexpression induit les promoteurs dépendants de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3, alors qu'un dominant négatif empêche l'induction de ces promoteurs par la stimulation de TLR3 (262). De plus, la mutation *Lps2*, qui induit chez les souris la résistance au choc septique causé par le LPS bactérien, a été identifiée comme étant localisée dans le gène codant pour TRIF (112). Des macrophages déficients en TRIF montrent une forte diminution de production de cytokines inflammatoires en réponse au ligand de TLR4, alors que des souris *knockout* pour TRIF et MyD88 perdent complètement l'activation de NF- $\kappa$ B en présence de LPS (264). Ainsi le point commun essentiel dans la voie indépendante de MyD88, menant à l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3, et reliée à TLR3 et TLR4, était découvert. Comme preuve supplémentaire de son importance, il a été montré que TRIF induisait la translocation de IRF-3 au noyau, et qu'ils co-immunoprécipitaient dans un même complexe (64). De plus, la surexpression de TRIF induit les promoteurs de l'IFN $\beta$ , de la chimiokine RANTES, de IP10 (gamma-interferon-inducible protein) et des IFN- $\alpha$ 1/ $\alpha$ 2 (64). Les figures 8 et 11 illustrent les différences entre les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de MyD88,

reliées aux TLR : plutôt que se former autour de MyD88, le complexe de molécules menant à l'induction génique se constitue avec TRIF comme base.

TRIF est une énorme protéine de 712 acides aminés, arborant un domaine TIR (acides aminés 394-532) (figure 10), donc membre de la superfamille de l'IL-1R/TLR (figure 4), et exprimée de façon ubiquitaire (262). L'induction de la transcription du gène *trif* est stimulée par les ligands de TLR2, TLR3 et TLR4, par le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\alpha$ , mais est insensible aux IFN. Enfin, il semblerait que NF- $\kappa$ B, qui possède un site de liaison dans le promoteur de *trif*, en soit le principal modulateur de la transcription (95). Par opposition, le promoteur de *MyD88* ne possède pas de motifs de liaison à NF- $\kappa$ B, mais à STAT1, IRF-1 et IRF-2 (97). Un mutant TRIF ne contenant que le C-terminal et le domaine TIR perd la capacité d'une bonne induction des IFN $\beta$ , mais pas de NF- $\kappa$ B, alors qu'un mutant contenant le N-terminal et le domaine TIR active toujours NF- $\kappa$ B et la production d'IFN $\beta$  (174). Ainsi, le N-terminal de TRIF serait impliqué dans l'activation d'IRF-3, alors que les deux extrémités serviraient à activer NF- $\kappa$ B, possiblement par des mécanismes distincts (voir plus bas, TRAF6 et RIP1).

Les voies menant à l'activation de NF- $\kappa$ B et ATF-2/c-Jun sont connues depuis longtemps, cependant, les kinases menant à la phosphorylation et à l'activation de IRF-3, l'autre facteur de transcription induit par la voie de signalisation indépendante de MyD88, ne furent découvertes que récemment. Les deux kinases apparentées à IKK, TBK1 (*TANK-binding kinase-1*) et IKK- $\epsilon$  (IkB kinase) ont été identifiées comme étant responsables de cette phosphorylation de IRF-3 (224, 65). Il sera question plus en détail de ces kinases plus loin.

La signalisation reliée à TLR3 et induite par le dsRNA ne fait probablement pas appel à l'adaptateur MyD88 (131) : il n'y aurait donc chez TLR3 qu'une voie indépendante de MyD88 et dépendante de TRIF, menant à l'activation de IRF-3 et de NF- $\kappa$ B, contrairement à TLR4, qui utilise ou non MyD88 (223). En effet, dans le cas de TLR4, la voie dépendante de MyD88 aurait pour rôle l'activation rapide de NF- $\kappa$ B et des MAP kinases, alors que la voie indépendante de MyD88 servirait, en plus d'induire la production d'interférons, à générer une deuxième phase, retardée, d'activation des MAP kinases et de NF- $\kappa$ B (264). La singularité de TLR3 dans sa capacité à lier directement TRIF et son incapacité probable à interagir avec MyD88



pourraient être expliquées par l'absence dans sa queue cytoplasmique de la proline conservée chez tous les autres TLR (10).

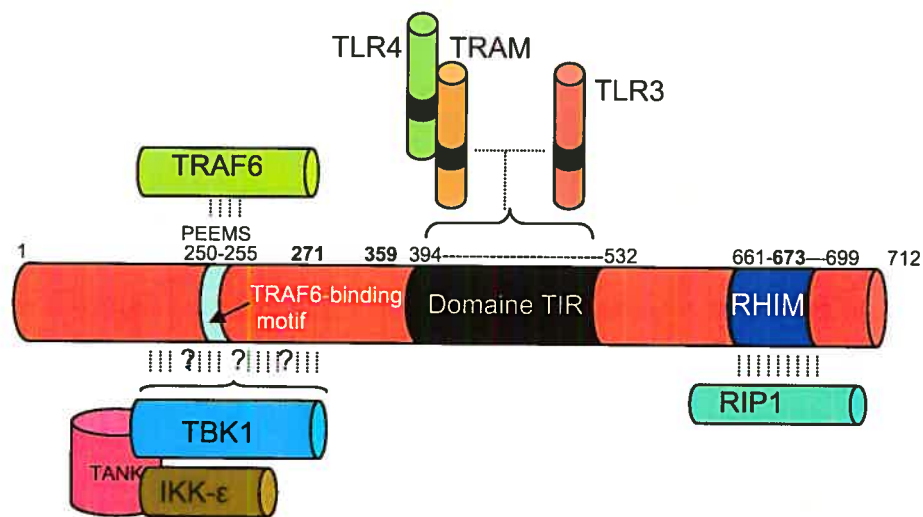
Pour TLR4, la liaison avec TRIF ne se fait pas directement : l'adaptateur de 235 acides aminés TRAM (TRIF-related adaptor molecule) ou TICAM-2, un autre membre de la superfamille de l'IL-1R/Toll (figure 4), est nécessaire comme intermédiaire (188) (figure 10). Des souris déficientes en TRAM montrent en effet un défaut dans la production de cytokines en réponse au ligand de TLR4, mais pas des autres TLR (265). La production d'IFN- $\beta$  via la voie indépendante de MyD88 est abolie chez ces souris lors de la stimulation de TLR4, mais pas de TLR3 (265). Donc, TLR4 recruterait deux adaptateurs différents, TIRAP (Mal) et TRAM (TICAM-2), qui s'associeraient à deux autres adaptateurs, respectivement MyD88 et TRIF (TICAM-1), pour activer les voies de signalisation dépendantes et indépendantes de MyD88 (188). La proline conservée dans le *BB-loop* de la plupart des domaines TIR ne l'est pas chez TRAM, où il y a à cette position une cystéine ; elle est cependant simplement déplacée d'une position (64).

La capacité de TRIF à activer à la fois les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3 a été reliée au fait qu'il puisse s'associer directement à des protéines impliquées dans ces deux voies. En effet, on a trouvé un *TRAF6-binding motif* en N-terminal de TRIF (PEEMSW acides aminés 250-255) (131), capable d'assurer une liaison avec le domaine TRAF de TRAF6, impliqué dans l'activation de NF- $\kappa$ B, ainsi qu'une capacité de TRIF à s'associer à la kinase TBK1, récemment découverte pour son implication dans l'activation de IRF-3 (215) (figure 10). En revanche IKK $\epsilon$  ne semble pas capable d'interagir avec TRIF (215), bien qu'elle soit impliquée dans l'activation d'IRF-3. La mutation du *TRAF6-binding motif* de TRIF résulte en une diminution de l'induction de promoteurs dépendants de NF- $\kappa$ B, mais pas d'IRF-3. Comme le *TRAF6-binding motif* est très près du site de liaison de TBK1 sur TRIF, il pourrait y avoir compétition entre les deux molécules, donc entre les deux voies de signalisation (215).

Cependant, chez des macrophages dépourvus de TRAF6, Gohda et ses collaborateurs ont remarqué une dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  et une activation des MAP kinases, en plus de la production de TNF $\alpha$  et IL-6, d'une même ampleur et avec une même cinétique que chez des macrophages de type sauvage, suite à la stimulation par le ligand de TLR3, poly(I :C) (81). De plus la production de IP10, contrôlée par la

voie IRF-3/interférons, n'est pas bloquée chez ces macrophages: TRAF6 ne serait donc pas absolument nécessaire à la signalisation via TLR3 (81). Ceci, en contradiction avec les observations précédentes (131), suggère donc un rôle de TRAF6 limité à la voie dépendante de MyD88 (81).

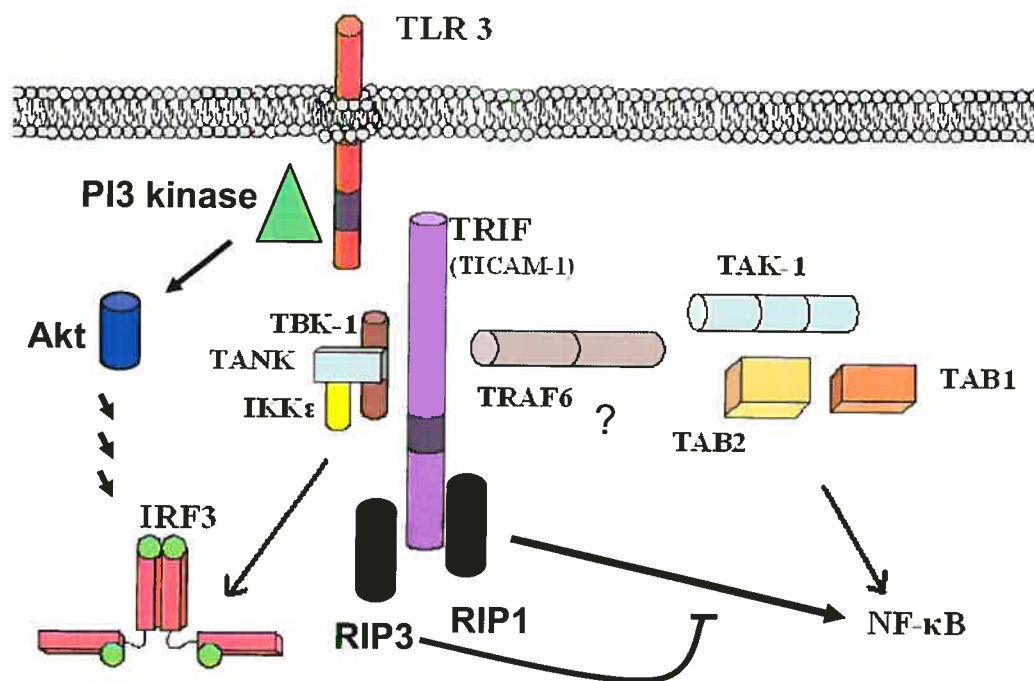
Récemment, un nouveau motif d'interaction d'environ 35 acides aminés a été découvert en C-terminal de TRIF, nommé RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) (174) (figure 10). En réponse au dsRNA, TRIF recrute via ce motif la sérine/thréonine kinase RIP1 (*receptor interacting protein*), déjà connue pour son rôle dans l'activation de NF- $\kappa$ B par le TNF, qui vient activer NF- $\kappa$ B, mais pas la MAP kinase JNK, ni la production d'IFN- $\beta$ . RIP1 remplacerait donc IRAK1, dont la séquence est fort homologue, dans la signalisation reliée à TLR3. La kinase RIP3, quant à elle, vient bloquer, en le phosphorylant, l'effet de RIP1 sur NF- $\kappa$ B, et pourrait peut-être servir à l'activation de JNK (174), mais ceci, tant que des souris RIP3<sup>-/-</sup> ne seront pas disponibles, reste à montrer.



**Figure 10: Représentation linéaire schématique des domaines de TRIF et des protéines s'y associant.** La localisation sur TRIF des domaines est indiquée par les chiffres au dessus de la protéine (1 à 712). L'adaptateur TRAF6 interagit avec TRIF via un TRAF6-binding motif (aa 250-255). La kinase TBK1 s'associe à TRIF dans une région voisine du TRAF6-binding motif, mais encore indéfinie. Le domaine TIR de TRIF permet l'interaction avec TLR3 et TRAM, alors que le domaine RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) permet le recrutement de RIP1. En gras sont indiqués les sites potentiels d'une phosphorylation de TRIF (voir texte et figures 12 et 19).

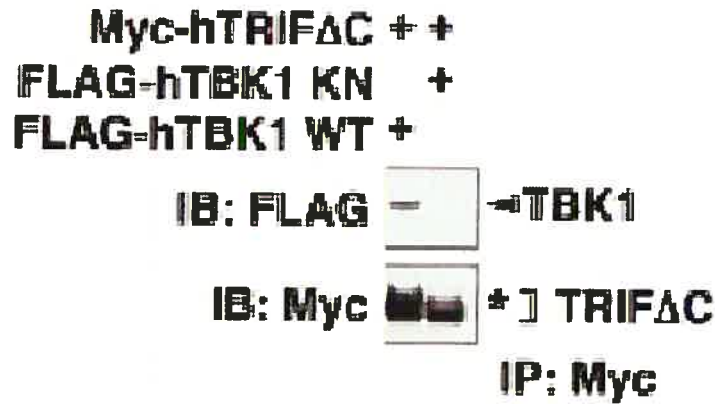
En plus de son rôle dans l'induction retardée de cytokines proinflammatoires et dans celle d'interférons, TRIF médie également l'apoptose, via un mécanisme différent impliquant son extrémité C-terminale (94). L'infection de cellules par le virus de Sendai induit l'apoptose, tout comme la surexpression de TRIF dans des cellules HEK 293. L'apoptose n'étant pas bloquée par l'introduction de mutants I $\kappa$ B, IRF-3, IRF-7, TBK1 ou IKK- $\epsilon$ , celle-ci ne serait pas dépendante de l'activation d'éléments ISRE et de NF- $\kappa$ B via TRIF. Il a été suggéré que l'apoptose passe par la voie FADD/caspase-8, liée à TRIF par la molécule RIP (94).

La phosphorylation de TLR3 sur des résidus tyrosine spécifiques de sa queue cytoplasmique, en particulier la Tyr759, suite à sa stimulation, a depuis peu été soulignée, pour son rôle dans le recrutement de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) (213). Des mutants TLR3 incapables d'être phosphorylés, ou l'utilisation de l'inhibiteur de la PI3 kinase, LY294002, ont causé la perte de la capacité d'induire la production de l'ARNm de p56, qui se fait directement via le facteur de transcription IRF-3 liant le promoteur *ISG56*. Cependant, l'inhibition de la PI3 kinase ou son incapacité à lier TLR3, n'ont pas empêché la dimérisation et la translocation au noyau d'IRF-3, mais seulement sa capacité à lier le promoteur *ISG56*. Cette perte de liaison d'IRF-3 au promoteur a été montrée comme la résultante de sa phosphorylation incomplète, en absence de PI3 kinase fonctionnelle. Il a été suggéré que la phosphorylation de TLR3 en Tyr759 mène au recrutement de la PI3 kinase, peut-être via un adaptateur inconnu, alors que la phosphorylation en Tyr858 mène à l'activation de la kinase TBK1. La phosphorylation d'IRF-3 impliquant la PI3 kinase ne se ferait pas directement, mais ferait appel à Akt et à d'autres protéines et la kinase responsable de la phosphorylation de TLR3 reste à découvrir. Il s'avère ainsi que la voie d'activation traditionnelle d'IRF-3 via TBK-1 n'est pas suffisante, et que la PI3 kinase est aussi impliquée dans la signalisation indépendante de MyD88.



**Figure 11: Voies de signalisations médiées par TRIF lors de la stimulation de TLR3 par l'ARN double-brin.**

Les mécanismes précis de l'activation de TRIF sont encore nébuleux. Cependant, on a remarqué que la co-immunoprécipitation de TRIF et de TBK1 a produit sur gel SDS-PAGE une bande retardée associée à TRIF (figure 12), qui est perdue lors de l'utilisation de TBK1 sans activité kinase (TBK1 KN), qui n'est même plus capable de lier TRIF (215). Ce retard sur gel pourrait signifier une phosphorylation de TRIF, impliquant l'activité kinase de TBK1. La phosphorylation est une modification post-traductionnelle réversible, fréquemment impliquée dans la régulation de l'activité de protéines. Il n'a cependant jamais été démontré directement que TRIF était phosphorylé, et les sites de cette potentielle phosphorylation de TRIF demeurent une *terra incognita*.



**Figure 12: La coimmunoprécipitation de TRIF et TBK1 montre sur SDS-PAGE une forme de TRIF migrant plus lentement que la coIP de TRIF et TBK1 KN.** Modifié à partir de : Sato S. et al. (2003). Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- $\beta$  (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- $\kappa$ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, 171: 4304-4310.

### 3) Les interférons

La voie de signalisation reliée à TLR3 et TLR4, indépendante de MyD88 et dépendante de TRIF mène à la production d'interférons (IFN) (64). Ces protéines, les premières cytokines à l'être, ont été découvertes en 1957, et doivent leur nom à leur capacité à interférer avec l'infection virale (124). En plus de leur implication dans la lutte anti-virale, elles sont connues pour contrer l'infection par des bactéries et d'autres pathogènes, en plus de participer à l'intégration entre la rapide réponse immunitaire innée et les événements plus tardifs contrôlés par le système immunitaire adaptatif (45). Les interférons n'induisent pas eux-mêmes une réponse anti-pathogènes, mais activent une série de gènes dont l'action coordonnée empêche la réplication et la dissémination de virus ou de bactéries (158).

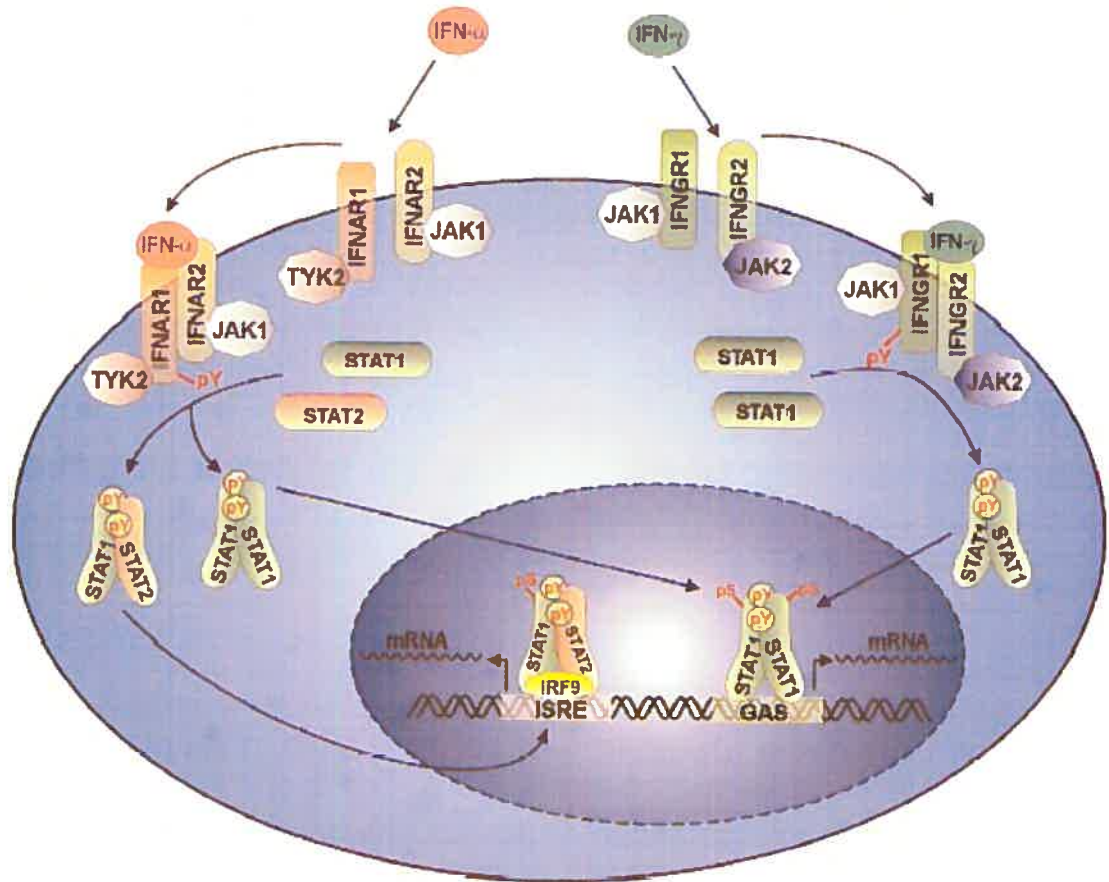
Les interférons sont aujourd'hui subdivisés en deux classes : les interférons de type I (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$  et limitine, les trois derniers ne se retrouvant pas chez l'humain) et les interférons de type II (IFN- $\gamma$ ), en plus de cytokines de type interférons (IL-28A ou IFN- $\lambda$ 2, IL-28B ou IFN- $\lambda$ 3, et IL-29 ou IFN- $\lambda$ 1) (197). Les interférons de type I peuvent être produits par tous les types de cellules, dans les conditions appropriées, alors que les IFN de type II,

activateurs des macrophages, sont restreints à certains types cellulaires : cellules NK et T<sub>H</sub>1 activées, et, en présence d'IL-12 et d'IL-18, DC activées et macrophages (45). On ne connaît qu'un gène (*ifnB*) codant pour l'IFN- $\beta$ , alors qu'il y a 13 gènes, très apparentés, codant pour les IFN- $\alpha$  (15). Les IFN de type I et de type II signalent par des voies distinctes mais reliées : des récepteurs spécifiques aux IFN de type I ou II recrutent les Janus kinases (JAK), qui propagent le signal via les *signal transducers and activators of transcription* (STAT) (figure 13) (230). Les STAT sont recrutés aux récepteurs phosphorylés en tyrosine par les JAK, via leur domaine SH2 (45). Le récepteur des IFN de type I consiste en deux chaînes, IFN- $\alpha$ R1 et IFN- $\alpha$ R2c, alors que celui des IFN de type II est formé des chaînes IFN- $\gamma$ R1 et IFN- $\gamma$ R2 (197).

L'activation des STAT, après leur liaison aux récepteurs, implique leur phosphorylation sur des résidus tyrosine spécifiques qui induit leur homo- ou hétérodimérisation via des interactions entre domaines SH2 (*Src homology domain*) : les dimères lient alors des séquences GAS (gamma-activated sequence) sur l'ADN pour moduler l'expression de gènes (230). Il existe différents STAT, formant une variété de dimères, qui induisent des éléments GAS différents, établissant ainsi une spécificité. De plus, les hétérodimères STAT1/2 et l'homodimère STAT1 s'associent à p48 (IRF-9), pour former le trimère ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor*) qui lie sur l'ADN des éléments ISRE (*IFN-stimulated gene element*) impliqués dans l'expression de la plupart des gènes régulés par les IFN de type I et quelques-uns régulés par les IFN de type II (230). Bien que les IFN de type I utilisent majoritairement STAT1 et STAT2, dans certaines cellules, et dans diverses conditions, il peuvent se servir de STAT3, STAT4, STAT5 ou de membres des IRF (197). En plus de la voie JAK/STAT, les IFN peuvent également activer, entre autres, la PI3 kinase, Akt, NF- $\kappa$ B, p21(ras)/Raf-1/MAPK et p53 (197).

Il existe des mécanismes capables de bloquer la signalisation induite par les interférons. Par exemple, PIAS3 (*protein inhibitor of activated STAT*) lie STAT3 et l'empêche de former un complexe avec l'ADN (37). Un membre de cette famille, PIASy interagit avec TRIF, ce qui mènerait à l'inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B et d'IRF-3 via TRIF, mais pas de l'apoptose (270). Aussi, les SOCS (*suppressor of cytokine signaling*) inhibent la signalisation de cytokines via les voies JAK/STAT par liaison directe au récepteur ou en empêchant l'accès au complexe de signalisation, en plus de donner possiblement un signal vers la dégradation par le

protéasome, dans le cas de JAK2 (13). Récemment, les SOCS ont été impliqués dans la régulation négative de la production d'IFN- $\beta$  suite à la stimulation des TLR (13).



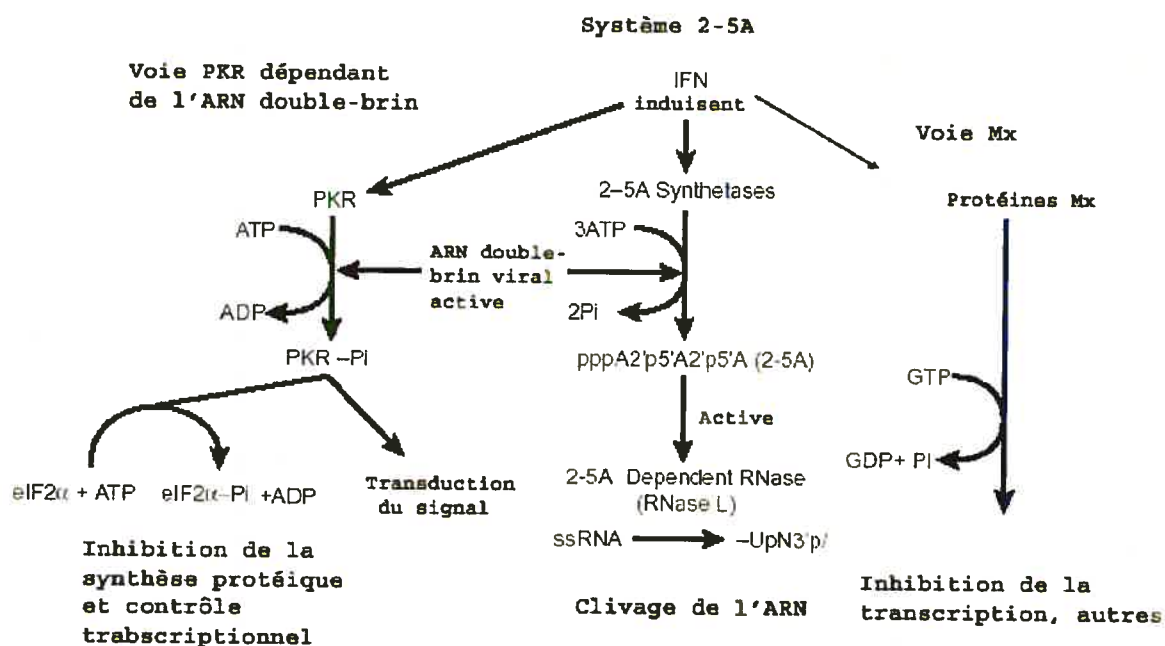
**Figure 13: Voies de signalisation impliquant les JAK/STAT reliées aux récepteurs des IFN.** Suite à la liaison des IFN aux récepteurs, les JAK activées phosphorylent ceux-ci, qui recrutent alors les STAT. Les JAK phosphorylent alors les STAT, qui dimérisent et transloquent au noyau pour activer la transcription de gènes sous contrôle de séquences GAS ou ISRE. Tiré de : Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest.*, **109**(10):1271-7.



### 3.1) Effets cellulaires et mécanismes de défense activés

Les effets, surtout autocrines et paracrines (267), des interférons sont multiples, allant de l'activation des cellules NK, à l'inhibition de la prolifération cellulaire et de la réplication virale (186), au contrôle de l'apoptose (230). Une étude par *DNA microarrays* a montré que les gènes induits ou réprimés par les IFN se comptaient par centaines (48). Par exemple, la maturation des DC est induite par les IFN de type I, qui causent également une polarisation d'un sous-groupe de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en T<sub>H</sub>1 et T<sub>H</sub>2, produisant respectivement de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-4 en grande quantité (15). Les différents IFN- $\alpha$  arborent des différences de l'ordre de 10<sup>4</sup> dans leur capacité à activer les cellules NK, allant jusqu'à l'antagoniser (197).

Plusieurs mécanismes antiviraux sont spécifiquement modulés par les IFN, par exemple, le système 2-5 oligoadénylate synthétase, le système de protéines de la famille Mx et PKR (230) (Figure 14). Les gènes modulés par les IFN incluent également ceux codant pour iNOS, RANTES, MCP-1 et IP-10 (45).



**Figure 14: Systèmes antiviraux induits par les interférons (IFN).**

Modifié à partir de : Stark, GR. (1998). How Cells Respond to Interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 227-264.



### 3.1.1) Système 2-5A

Le système 2-5A est activé par les interférons, de type I ou II et est impliqué dans le clivage de l'ARN simple-brin (230, 32), d'origine virale ou cellulaire, ce qui limite la réplication virale et la croissance cellulaire (52). Cette voie de défense antivirale est initiée par l'activation d'enzymes de la famille des 2-5oligoadénylate synthétases (OAS), dont l'expression est induite par les interférons (31, 32) et l'activation requiert la liaison directe d'ARN double-brin viral (78, 96). On compte 6 isozymes différents des OAS (40, 46, 67, 69, 71 et 100kDa) (230) résultant de l'épissage alternatif (79) de 4 gènes codés chez l'humain sur le chromosome 12 (61). Leur expression dépend du type cellulaire étudié (167). Les produits des OAS sont les 2'-5'-oligoadénylates, des polymères d'acides nucléiques, dont la longueur dépend de l'isoforme d'OAS (211), responsables de l'activation de la RNase L (230). Les OAS sont les seules enzymes connues à posséder une activité de transfert de nucléotides en 2' (96). On saisit encore mal la raison de l'existence de 6 membres identifiés des OAS responsables de l'activité redondante de production des 2'-5'-oligoadénylates; cependant, il a été montré qu'une de ces isozymes, possédant un *Bcl-2 homology domain* induisait l'apoptose, indépendamment de son activité enzymatique (79). Cette isozyme est la seule connue à avoir cet effet, ce qui laisse soupçonner des rôles encore inconnus aux autres OAS.

Les 2'-5'-oligoadénylates, produits à partir d'ATP, ont pour rôle l'activation de la RNase L latente, indépendamment de leur longueur, mais nécessitant un groupement phosphate à leur extrémité 5' (32). Leur action est transitoire, du fait de l'existence d'une phosphodiesterase clivant préférentiellement les oligonucléotides 2'-5'-liés (167). La RNase L est composée d'un domaine N-terminal régulateur et d'un domaine C-terminal catalytique : la délétion des 335 résidus en N-terminal la rend constitutivement active (53). On retrouve en N-terminal un motif P-loop répété (273) et 9 ankyrin repeats nécessaires et suffisantes à la liaison des 2'-5'-oligoadénylates, dont 3 sont impliquées dans la fonction de répression (53). La région C-terminale contient une région d'homologie protéine kinase, un domaine riche en cystéines et le domaine ribonucléase (230). La liaison des 2'-5'-oligoadénylates, dans un rapport stoechiométrique sous-unité de RNase L:activateur de 1:1 (31), induit une homodimérisation de la RNase L, qui la rend active (52).

L'activation de la RNase L est réversible, la privation de 2'-5'-oligoadénylates la désactivant (32). Le système 2-5 A semble être particulièrement important pour la lutte contre les picornavirus : une surexpression de OAS confère une résistance à leur infection (35), alors que l'expression d'un mutant inactif de la RNase L induit une plus grande sensibilité à ceux-ci (273).

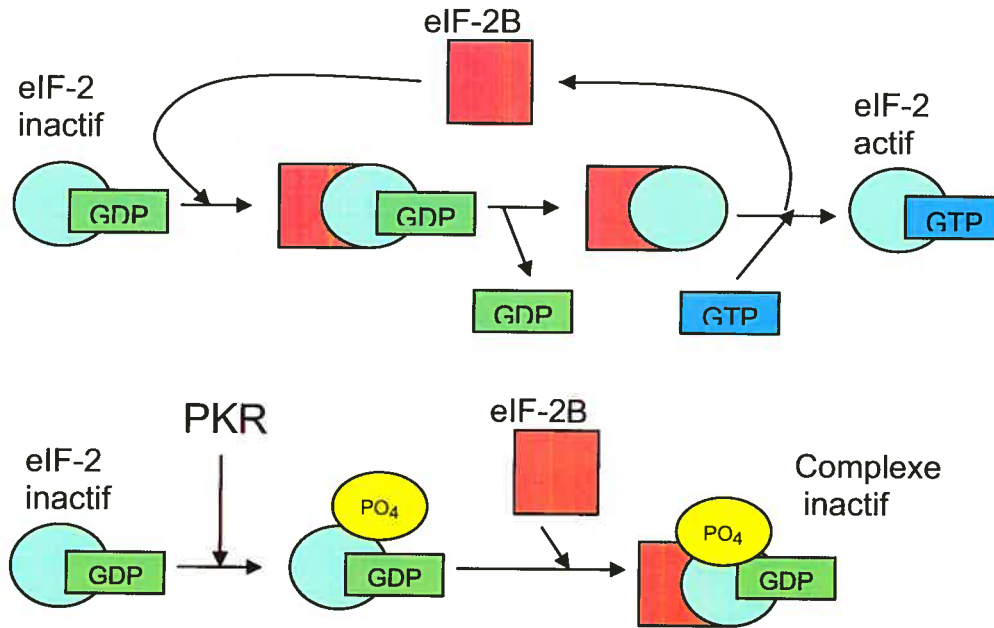
### **3.1.2) Système Mx**

Les protéines Mx sont des GTPases d'environ 70-80 kDa induites par les interférons et appartenant à la superfamille des dynamines (93). Elles ont été découvertes chez des souris dotées d'une résistance inhabituelle au virus de l'influenza (117). On retrouve chez l'humain 2 de ces protéines, MxA et MxB, dont seule la première semble posséder une activité anti-virale (93). Son action est dirigée principalement contre les virus à ARN et semble viser plusieurs étapes de la réplication virale : blocage du transport vers le noyau de la nucleocapside virale chez le virus de Thogoto (145, 146) ou inhibition de la transcription par interaction avec les sous-unités PB2 et NP de l'ARN polymérase chez le virus de l'influenza (249). Les virus sensibles à la MxA incluent les bunyavirus, les orthomyxovirus, les paramyxovirus, les rhabdovirus, les togavirus, les picornavirus et le virus de l'hépatite B (93). La liaison de MxA avec le GTP est une étape obligatoire à son activité antivirale: MxA lie la nucléocapside du virus de Thogoto uniquement en présence de GTP (145). Le domaine GTPase de MxA et une *self assembly sequence* (SAS) résident en N-terminal, alors que son extrémité C-terminale sert de domaine effecteur et possède un motif de *leucine zipper* qui sert à l'activation de la GTPase (93). Au milieu de la molécule se trouve un *central interactive domain* (CID). Une propriété intéressante de la protéine MxA est sa capacité à former un oligomère dont la conformation change en présence de GTP (145, 146). Contrairement au système 2-5A qui est activé par les interférons de type I ou II, les protéines Mx sont préférentiellement activées par les interférons de type I (230).

### 3.1.3) PKR

La dsRNA-dépendante protéine kinase est une sérine/thréonine kinase de 68kDa, dont l'expression est induite par les interférons et activée par l'ARN double-brin, en présence d'ATP (173). Présente de façon latente et inactive, la liaison d'ARN double-brin induit son autophosphorylation, qui enclenche la phosphorylation de ses substrats (230). Le mieux connu de ceux-ci est le *eukaryotic translation initiation factor 2* (eIF2), qu'elle phosphoryle en sérine 51 de sa sous-unité alpha, ce qui augmente son affinité pour le facteur de recyclage eIF2B (figure 15). Il y a ainsi formation d'un complexe qui séquestre eIF2B et l'empêche de transférer des nucléotides sur eIF2 non-phosphorylé, bloquant la traduction (46).

En plus de son effet antiviral, PKR aurait un rôle à jouer dans la croissance, la différenciation cellulaire (198) et la suppression de tumeurs (14), son abrogation causant la transformation dans certains types cellulaires (54). PKR servirait également de second messager en médiant l'activation des *immediate-early genes* c-fos et c-myc par le PDGF (177). En réponse à l'ARN double-brin, il a de plus été montré que PKR était capable d'interagir avec et de phosphoryler MKK6, un activateur de la MAP kinase p38 (225). La liaison de l'ARN double-brin se fait en N-terminal de la PKR, à l'aide de deux *dsRNA binding motifs* de 20kDa en tandem, alors que le domaine catalytique se trouve en C-terminal (180). Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B peut aussi être activé par un mécanisme impliquant PKR, mais indépendant de son activité kinase : elle servirait ici de protéine d'échafaudage en collaboration avec IKK $\beta$  (101). On constate donc que la PKR est une kinase aux rôles multiples, impliquée à la fois dans la défense cellulaire et le maintien de l'homéostasie.



**Figure 15: Cycle de eIF-2 et rôle de PKR dans son inhibition.** La protéine eIF-2 permet la liaison de l'ARN de transfert chargée d'une méthionine à la petite sous-unité du ribosome et l'initiation de la traduction. La forme active est liée à un GTP, alors que l'hydrolyse du GTP en GDP, après l'initiation de la traduction, l'inactive et la fait dissocier du complexe. La protéine de relâche de nucléotide guanine (eIF-2B) permet l'échange de GDP pour du GTP sur eIF-2. La phosphorylation de eIF-2 par la PKR augmente fortement son affinité pour eIF-2B. Cette dernière étant ainsi séquestrée, elle ne peut permettre le recyclage de eIF-2 et la traduction est inhibée. Modifié à partir de : 5 B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 3<sup>rd</sup> Edition. Garland Publishing, New York.

### 3.2) Régulation de l'expression des interférons: les IRF

Compte tenu des effets puissants des interférons, qui incluent le contrôle positif ou négatif de l'apoptose ou de la prolifération cellulaire (230), leur expression doit être sévèrement contrôlée. Les membres de la famille de facteurs de transcription des *Interferon regulatory factors* (IRF) jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des IFN de type I, des gènes sous contrôle des IFN (*interferon-stimulated genes* (ISG)) ainsi que d'autres cytokines et chimiokines (15). Les divers IRF sont différemment exprimés selon le type cellulaire et peuvent agir comme répresseurs ou activateurs de la transcription (164). Par exemple, le ratio entre IRF-3 et IRF-7 est important dans l'induction de l'expression des IFN de type I,

alors que IRF-3 seul suffit à l'expression du gène *IFNB*. De plus, il a été montré que IRF-1 et IRF-2 jouent un rôle significatif dans la croissance cellulaire et l'apoptose (246). IRF-5, dont l'activation est spécifique à certains virus, est impliqué dans l'induction de gènes *IFNA* distincts de ceux induits par IRF-7 (15).

Sont aujourd'hui connus 10 IRF (164; 182; 245), qui contiennent typiquement un domaine conservé de liaison à l'ADN (DBD) en N-terminal (69) arborant une répétition caractéristique de 5 résidus tryptophane (164). Ce DBD permet aux IRF la liaison avec des motifs sur l'ADN, présents sur la plupart des gènes induits par les IFN, et nommés *IFN stimulated response element* (ISRE), *IFN consensus sequence* (ICS) ou IFN regulatory elements (IRE) (164). Les IRF sont donc capables d'activer rapidement, suite à leur induction, des gènes sous contrôle de séquences ISRE, en comparaison avec la voie JAK/STAT qui est activée seulement après la synthèse d'une première vague d'interférons : l'activation d'IRF serait ainsi une étape précoce de la réponse anti-pathogènes. Par exemple, suite à l'infection virale, des gènes de type *immediate-early* (IE) (IFN- $\beta$  et IFN- $\alpha$ 1) sont activés rapidement, par des IRF notamment, sans nécessité de néosynthèse protéique, alors que des gènes de type retardés (autres IFN- $\alpha$ ) sont dépendant de la vague de nouvelles protéines traduites (222).

La structure cristalline de IRF-1 lié à l'élément *positive regulatory domain 1* (PRD 1) du promoteur de l'IFN- $\beta$  a révélé l'importance des résidus tryptophane sur les IRF et des répétitions GAAA qu'on retrouve sur les éléments de réponse aux IRF dans l'interaction protéine-ADN (60). Par exemple, le promoteur des gènes codant pour les IFN- $\alpha$  possède une série de répétitions AANNGAAA, où NN varie en fonction du sous-type d'IFN- $\alpha$ , capables d'être liées par les IRF (15).

La puissance des IRF est exploitée par certains virus, comme le *human herpesvirus 8* (HHV-8), responsable probable du sarcome de Kaposi. En effet, celui-ci est capable de produire un homologue des IRF, nommé vIRF, apte à bloquer, entre autres, l'action de IRF-1 (274).

### 3.2.1) IRF-3

Le facteur de transcription IRF-3 est exprimé dans tous les types cellulaires examinés, des cellules immortalisées/tumorales aux lignées fraîchement isolées (222). Il est présent dans le cytoplasme de façon latente et, suite aux signaux transmis lors d'une infection, il subit une translocation au noyau et active la transcription de gènes impliqués dans la lutte contre les pathogènes (267).

La localisation cytoplasmique de IRF-3 est due à la présence d'un puissant signal d'exportation nucléaire (NES) : son activation par phosphorylation induit un changement conformationnel qui révèle son *IRF association domain* (IAD) et son *DNA binding domain* (DBD) (figure 16), causant une dimérisation, une translocation nucléaire, et la liaison à des séquences consensus 5'-GAAAC/GC/GGAANT/C-3' sur l'ADN (220). Auparavant, IRF-3 forme un complexe avec l'histone-acétyltransférase CBP (CREB Binding Protein) (154) et p300, ce qui permet de pousser l'équilibre de sa localisation vers le noyau, au détriment du cytoplasme (220). C'est la dimérisation qui induit la formation d'une pochette acide permettant la liaison de CBP/p300 (237). CBP agit comme co-activateur, puisque son activité histone-acétyltransférase est essentielle pour permettre aux constituants de la machinerie transcriptionnelle de base d'avoir accès aux promoteurs induits par IRF-3, mais aussi comme ancre, pour sa capacité à empêcher l'exportation de IRF-3 hors du noyau (222).

L'induction de la transcription du gène *IFNB* requière la formation d'un complexe de signalisation nommé *enhanceosome*, comprenant, outre IRF-3, les facteurs de transcription ATF-2/c-Jun, IRF-7, NF-KB et la protéine de structure HMGI(Y) (107, 190). La présence du seul IRF-3 n'est donc pas suffisante à induire l'expression d'IFN- $\beta$  endogène humain (110). La protéine HMGI(Y) modulerait la structure de l'ADN, afin de la rendre plus conforme à la forme requise à l'assemblage efficace de l'*enhanceosome* (190). IRF-3 interagit de plus avec la *p300/CBP-associated factor* (PCAF) et *TBP-associated factor 250* (TAFII250) (156). Le rôle de cet *enhanceosome*, sis dans la partie dépourvue de nucléosome de l'enhancer de *IFNB*, est le recrutement ordonné de facteurs de modification de la chromatine et de facteurs généraux de transcription (2). L'infection virale induit l'hyperacétylation des histones H3 et H4, localisées dans le promoteur de l'IFN- $\beta$ , et

un IRF-3 tronqué, dépourvu de domaine d'interaction à CBP/p300 supprime cette hyperacétylation et l'induction de *IFNB* (191). Il a également été montré que l'acétylation d'un nucléosome masquant la boîte TATA permettait le recrutement des complexes d'holoenzymes GCN5 et CBP/PolII, suivi de l'arrivée de SWI/SNF qui le remodelent et permettent l'interaction avec TFIID et la constitution d'un complexe de pré-initiation de la transcription (2).

IRF-3 est impliqué, entre autres, dans l'induction de l'expression de l'IFN- $\beta$ , de RANTES et de ISG-54/56 (64). La protéine ISG56 a un rôle antiviral en bloquant l'initiation de la traduction par liaison de la sous-unité p48 du facteur 3 de l'initiation de l'élongation (eIF3) (110). Le promoteur du gène codant pour la chimiokine RANTES possède trois éléments ISRE qui sont responsables de l'interaction avec IRF-3 : la cotransfection d'un IRF-3D, constitutivement actif et d'un rapporteur RANTES génère une forte induction de celui-ci. La transfection du répresseur IRF-2 bloque son induction par le virus de Sendaï, alors que IRF-1 et IRF-7 sont sans effets (155).

IRF-3 est codé par un gène présent en une seule copie dans le génome humain, et dont l'expression est constitutive et non modulée par l'infection virale ou le traitement aux IFN (12). Il a été identifié par la recherche d'homologie, parmi une banque d'ADN complémentaires, avec des membres des IRF (12).

Il existe un isoforme d'IRF-3, IRF-3a, résultant de l'épissage alternatif, dont les 55 résidus en N-terminal, dans le domaine de liaison à l'ADN (DBD), ont été remplacés par 20 autres résidus (137). L'expression de IRF-3a est ubiquitaire, mais son niveau varierait selon le tissu. Il a été montré que cet isoforme pouvait sélectivement et puissamment inhiber l'induction du promoteur de l'IFN- $\beta$  par un virus (138). Incapable de lier les éléments ISRE ISG15 ou PRD I/III, IRF-3a pourrait par contre former des hétérodimères avec IRF-3, suite à l'infection virale (138). Il s'agirait d'un point de contrôle supplémentaire dans la modulation de l'expression des gènes dépendant de IRF-3.

L'activation de IRF-3 implique sa phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine spécifiques dont l'identité précise demeure sujette à débats (176, 221). Ainsi, deux équipes ont tenté de déterminer le site phosphoaccepteur minimal sur la séquence porteuse d'un amas de sérines, <sup>382</sup>GGASSLENTVDLHISNSH-PLSLTSDQY<sup>408</sup>, dont la phosphorylation était connue (267). Par la génération de

mutants ponctuels dans cette région et la détermination de leur effet sur l'expression de gènes rapporteurs tels *IFN-α*, *IFN-β* et *RANTES*, l'équipe de Servant a identifié la sérine 396 comme site critique de la phosphorylation (221). De plus, la phosphorylation *in vivo* de Ser<sup>396</sup>, suite à l'infection de cellules HEK293 par le SeV, a pu être détectée par immunobuvardage, grâce un anticorps phosphospécifique contre PO<sub>4</sub>-IRF-3 (221). Cependant, l'équipe de Mori a, en partant du fait qu'un mutant dont les sérines 385 et 386 étaient remplacées par des alanines (IRF-3 2S/A) perdait complètement son activité, alors que la même substitution chez les sérines/thréonines 396, 398, 402, 404 et 405 (IRF-3 5ST/A) conservait à la protéine la capacité d'homodimériser, d'associer avec CBP/p300 et un certain potentiel de transactivation, suggéré que c'était le premier site qui était critique (176). Ils ont de plus trouvé que l'anticorps phosphospécifique anti-PO<sub>4</sub>-IRF-3 manquait de spécificité et semblait contenir une grande proportion d'anticorps réagissant à IRF-3 non phosphorylé. En revanche, leur anticorps phosphospécifique contre le site PO<sub>4</sub>-Ser-386 d'IRF-3 leur a permis de détecter une phosphorylation de cette sérine en réponse à l'infection virale par NDV ou au traitement de cellules au dsRNA ou au LPS (176). La controverse n'est pas close sur ce sujet, et, bien que la région de phosphorylation en C-terminal d'IRF-3 soit circonscrite aux acides aminés 382-408, les sites précis et leur importance relative et/ou leur potentielle cinétique de phosphorylation différente ne font pas l'objet d'un consensus.

Comme preuve supplémentaire de l'importance de la région porteuse de l'amas de Ser, il a été montré que la substitution des sérines et thréonines dans la région aa396-aa405 de IRF-3 (figure 16) par des acides aspartiques phosphomimétiques crée une protéine constitutivement active (IRF-3 5D), capable d'induire la transcription en absence d'infection virale, mais aussi d'induire l'apoptose (110).





**Figure 16: Représentation linéaire schématique du facteur de transcription IRF-3 et de ses sites phosphoaccepteurs.** Les domaines représentés comprennent le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine de transactivation (aa 134-394), le signal de localisation nucléaire (NLS), le signal d'exportation nucléaire (NES), les 2 domaines autoinhibiteurs situés dans la séquence riche en proline (aa 134-197) (Pro) et en C-terminal (aa 407-414), le domaine d'association aux IRF (IAD) et le domaine de réponse au signal (RD), contenant les sérines phosphoacceptrices. Modifié à partir de: Servant, M., Tenoever, B., Lin, R. (2002). Overlapping and Distinct Mechanisms Regulating IRF-3 and IRF-7 Function. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22: 49-58.

On peut discerner sur gel d'acrylamide quatre formes d'IRF-3 (I à IV), de 55kDa, ayant des mobilités électrophorétiques différentes. Les formes III et IV, plus lentes, apparaissent lorsque IRF-3 est phosphorylé en C-terminal, alors que les formes I et II, plus rapides, sont dues à une phosphorylation en N-terminal du facteur de transcription, dont les rôles sont toujours obscurs (220). En effet, les agents inducteurs de stress, les facteurs de croissance, les agents endommageant l'ADN, et des cytokines telles la doxorubicine et le TNF- $\alpha$  induisent, par le biais d'une voie liée à une MAPKKK, la phosphorylation en N-terminal, mais pas en C-terminal (219). La structure cristalline du domaine de transactivation de IRF-3 a révélé que le *IRF association domain* (IAD) et les éléments autoinhibiteurs adjacents se condensent pour former un noyau hydrophobe, en absence de stimulation. La phosphorylation induirait une réorganisation des éléments autoinhibiteurs, exposant les surfaces hydrophobes des hélices H3 et H4, repositionnant le DBD en N-terminal, ce qui permettrait l'activation d'IRF-3 (202).

### **3.2.1.1) Kinases impliquées dans l'activation d'IRF-3**

L'identité des kinases menant à la phosphorylation d'IRF-3, désignées auparavant par le nom générique VAK (*Virus-activated kinase*) a été longtemps un mystère, même si la candidature de PKR et de IκB kinase ait rapidement été discréditée (227). Les kinases IKKε (IκB kinase-ε), aussi nommée IKK-i, et TBK1 (TANK-binding kinase-1), également connue sous le nom de NAK (NF-κB-activating kinase) ou TRAF2-associated kinase (T2K), ont été identifiées comme faisant partie d'un complexe kinase menant à cette phosphorylation (65, 224). Leur surexpression mène à l'induction des promoteurs de RANTES et de l'IFN-β, ainsi qu'à une activation directe de IRF-3, bloquée par des ARNi (65). L'implication de la kinase p38 dans l'activation de IRF-3 a aussi été montrée (181), ainsi que la capacité de TBK1 à phosphoryler directement IRF-3, en même temps que l'effet inhibiteur sur l'expression de gènes dépendants d'IRF3 par l'introduction d'un phénotype TBK1<sup>-/-</sup> (171).

Les deux kinases TBK1 et IKKε, des homologues non canoniques de IκB kinase, étaient connues pour leur implication dans l'activation de NF-κB (65). L'aptitude de TANK à activer NF-κB, de façon dépendante de TRAF, a mené à la découverte de son association avec TBK1 et du fait qu'elle semblait agir en amont des IKK (201). De plus, la liaison de TANK avec NEMO/IKKγ est requise, en conjonction avec IKKε et TBK1, à l'activation de NF-κB (34). Ainsi, TBK1, IKKε et TANK pourraient former un complexe structurel, impliqué dans l'activation des facteurs de transcription IRF-3 et NF-κB. Des souris déficientes en TBK1, bien qu'elles montrent une dégradation de IκB et une liaison de NF-κB normales, sont aux prises avec une transcription dépendante de NF-κB dramatiquement réduite, ainsi qu'avec de l'apoptose massive des cellules hépatiques (22). Cette kinase serait donc impliquée dans l'activation de NF-κB indépendamment de la dégradation de IκB ou de la liaison de NF-κB. Il est connu que la sous-unité p65 de ce facteur de transcription est phosphorylée en sérine 536, dans le domaine C-terminal de transactivation, sans qu'un rôle précis y soit associé. Or, il semblerait que cette phosphorylation ait un rôle dans le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base, du moins au niveau du promoteur de l'interleukine-8. Cette phosphorylation

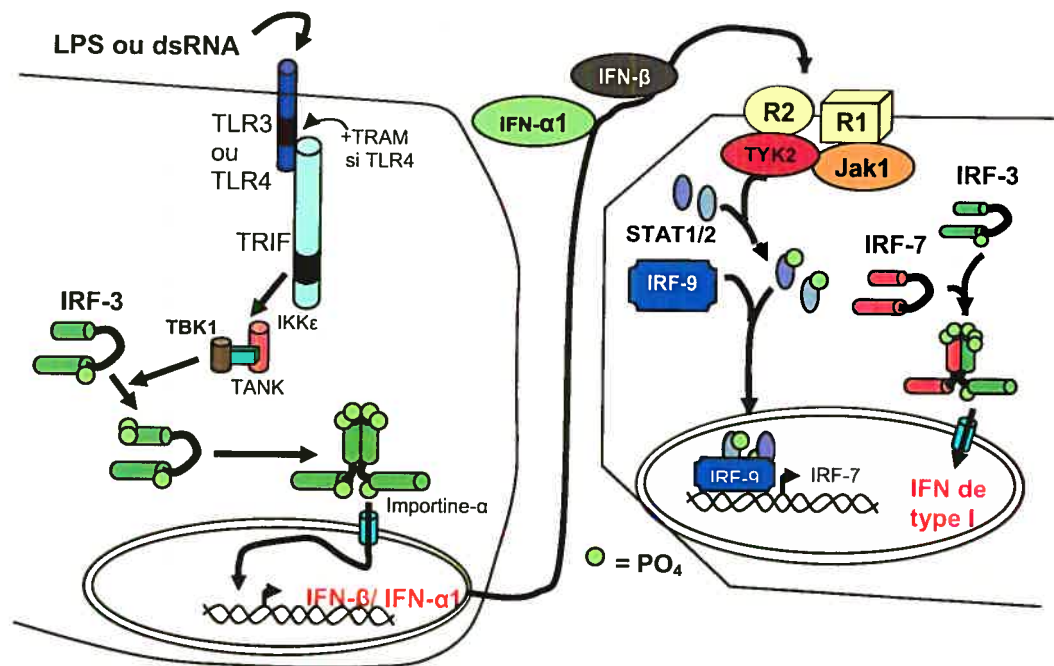
serait effectuée par une série de kinases différentes, comprenant TBK1, IKK- $\epsilon$ , IKK- $\alpha$  et IKK- $\beta$  (29).

L'implication relative de IKK $\epsilon$  et de TBK1 dans la signalisation en réponse au dsRNA et au LPS et leurs rôles physiologiques ont été déterminés: des fibroblastes embryonnaires (MEF) de souris TBK1<sup>-/-</sup> montrent une forte baisse de l'induction de l'IFN- $\beta$  et des gènes y étant sensibles, en réponse au LPS et au dsRNA. Cependant, ces MEF conservent une réponse résiduelle au dsRNA et des MEF IKK $\epsilon$ <sup>-/-</sup>, une réponse intacte. Un double mutant perd cependant complètement l'induction des gènes étudiés. (107). Selon le modèle actuel, TBK-1 serait essentielle à la réponse antivirale, mais l'action concomitante des deux kinases aurait une action synergique.

Une équipe a observé, suite à la stimulation de TLR3, une phosphorylation faible de IRF-3 et l'induction subséquente d'éléments ISRE, par la kinase IKK- $\beta$  (94), en contradiction avec les observations précédentes. Il semblerait que la surexpression de IKK- $\beta$  ne puisse induire un rapporteur sous dépendance du promoteur de l'IFN- $\beta$ , tel qu'utilisé dans les études antérieures, mais puisse activer d'autres éléments ISRE. De plus, cette équipe a suggéré, suite à des essais rapporteurs sur différentes combinaisons de mutants TBK1, IKK- $\beta$  et IKK- $\epsilon$ , que TBK1 mènerait à l'activation d'éléments ISRE via IKK- $\beta$  et/ou IKK- $\epsilon$ , alors que IKK- $\beta$  le ferait par l'intermédiaire de IKK- $\epsilon$  (94). L'utilisation d'un mutant constitutivement actif de IRF-3, où les 5 sérines importantes sont mutées en acide aspartique phosphomimétique, IRF-3 5D, a tout de même permis de repérer une phosphorylation sur des sérines supplémentaires, lors d'un essai kinase réalisé avec IKK- $\epsilon$ , mais pas IKK- $\beta$ . Ceci suggère que l'action de IKK- $\epsilon$  s'étendrait à des sites supplémentaires sur IRF-3, alors que celle de IKK- $\beta$  se confinerait aux 5 sérines déjà identifiées (94).

Malgré une faible homologie de séquence, la structure tridimensionnelle du domaine régulateur C-terminal de IRF-3 est similaire au domaine *Mad homology domain 2* (MH2) des facteurs de transcription Smad, impliqués dans la signalisation reliée au récepteur du TGF- $\beta$ , ce qui suggérerait une origine évolutive commune (237). Une autre caractéristique commune entre IRF-3 et les Smad est la coopération avec le co-activateur p300/CBP (175).

L'activation d'IRF-3 et la transcription de gènes sous son contrôle ne sont que la première étape d'une cascade d'événements menant à terme à l'éradication de l'infection. En effet, les gènes d'IFN pourraient être catégorisés en *immediate-early* (IE) et en *delayed-type* : les premiers sont rapidement transcrits à la suite de l'infection, par la modification post-traductionnelle de facteurs de transcription latents, tels IRF-3, alors que les seconds requièrent souvent une synthèse protéique (222). Ainsi, IRF-3, suite à son activation, engendre la production d'IFN de type I qui, via les récepteurs des IFN et la voie JAK/STAT, en conjonction avec IRF-9, viennent stimuler la production d'IRF-7. La dimérisation de IRF-3 et IRF-7 vient alors induire la genèse d'une nouvelle vague d'IFN, résultant en une boucle d'amplification (222).



**Figure 17: Représentation schématique de l'activation d'IRF-3/IRF-7 par la voie TRIF/TBK1 et de l'induction de la transcription d'IFN de type I, suite à la stimulation de TLR.** La stimulation de TLR3 ou TLR4, en recrutant TRIF (via TRAM dans le cas de TLR4), mène à l'activation du complexe TBK1/IKK-ε/TANK et à la phosphorylation en C-terminal de IRF-3. Suite à l'homodimérisation de IRF-3, à son association à CBP/p300 (non-illustrées) et à sa translocation au noyau, la transcription des IFN-α1 et IFN-β est induite. Les produits de ces gènes viennent ensuite stimuler, de façon autocrine ou paracrine, les récepteurs 1 et 2 des IFN, qui, via la voie des JAK/STAT, et avec l'aide de IRF-9 (complexe ISGF3), mènent à la transcription de IRF-7. Par la suite, IRF-3 et IRF-7 phosphorylés (voir cellules de gauche) hétérodimérisent et activent la transcription d'IFN de type I. Adapté de : Servant, M., Tenover, B., Lin, R. (2002). Overlapping and Distinct Mechanisms Regulating IRF-3 and IRF-7 Function. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 22: 49-58.

Entre les récepteurs TLR3 et TLR4 et le facteur de transcription IRF-3 sont donc impliqués l'adaptateur TRIF (et TRAM dans le cas de TLR4) et les kinases TBK1 et IKKε. Bien que le schéma général de l'induction de gènes sensibles à IRF-3 se précise, il reste des points obscurs, tels le mécanisme d'activation de TRIF, qui semble phosphorylé (215), et l'identité de la kinase impliquée dans la phosphorylation de TLR3 (213).

### 3.2.1.2) Dégradation d'IRF-3

Finalement, il a été montré qu'après quelques heures d'infection, IRF-3 commençait à subir une dégradation dépendante du protéasome (154). Cette protéase eucaryote, consommatrice d'ATP, est un complexe d'environ 2000kDa capable de dégrader des protéines avec spécificité (275), par exemple via la reconnaissance de motifs PEST (49). Un tel mécanisme de contrôle de la durée de l'activation d'IRF-3 est crucial, compte-tenu des effets puissants de ce facteur de transcription. Or, la protéolyse médiée par le protéasome implique l'ubiquitination des protéines ciblées, laquelle requiert un système élaboré de transfert d'ubiquitine (217). Les mécanismes impliqués dans cette ubiquitination d'IRF-3 restent inconnus. Il a été montré que, pour plusieurs protéines qui, comme IRF-3, sont hyperphosphorylées, cette modification post-traductionnelle induit la dégradation via le protéasome (49).

L'ubiquitination de substrats induite par l'hyperphosphorylation a été associée avec le complexe E3 ubiquitine-ligase SCF (Skp1-Cullin1-Fbox) (19, 28) : les efforts pourraient ainsi se tourner vers les complexes SCF afin d'identifier le potentiel responsable de la protéolyse d'IRF-3. Dans de tels complexes, la *F-box protein* (par exemple Skp2) interagit avec le substrat, Skp1 sert d'adaptateur avec la protéine de structure Cul1, alors que Rbx1 s'associe aux autres composantes du système d'ubiquitination (272). La liste des exemples de protéines dont la dégradation par le protéasome est assurée via ce système continue à s'allonger : p27<sup>Kip1</sup>, E2F-1, la cycline E libre, ORC1, CDK9 et B-Myb (135). Chez toutes ces protéines, c'est Skp2 qui agit comme *F-box protein* et il serait intéressant de savoir si IRF-3 pourrait s'ajouter à cette liste.

#### 4) Pathogènes bactériens

Le facteur de transcription IRF-3 est activé suite à la stimulation des TLR3 et TLR4, responsables respectivement de la reconnaissance de structures liées à des virus et à des bactéries GRAM-. L'effet principal de IRF-3 est l'induction de la production des IFN- $\beta/\alpha 1$  et des cytokines RANTES et IL-15 (222) et IP-10 (171), ainsi que de ISG54/56 (64) et de l'arginase de type II (85). Les interférons sont originellement et majoritairement connus pour leurs effets antiviraux, mais ils sont également impliqués dans la défense antibactérienne.

En effet, il est connu qu'IRF-3 est activé suite à l'exposition d'une cellule au LPS, mais aussi à la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes*, ce qui suggérerait que, comme pour les virus, ce facteur de transcription serait un important médiateur de la production d'IFN de type I suite à l'invasion bactérienne (45). Les IFN de type I sensibiliseraient les macrophages infectés par *L.monocytogenes* à la mort cellulaire, par un mécanisme dépendant de STAT1 (45). Les données disponibles sur le rôle des IFN contre les bactéries sont encore peu nombreuses et contradictoires : des souris infectées par *Mycobacterium tuberculosis* montrent une aggravation de l'infection pulmonaire suite à l'administration intra-nasale d'IFN- $\alpha/\beta$ , et la virulence des bactéries est directement proportionnelle à la quantité d'IFN produits (165), cependant qu'une autre étude montre une légère augmentation de la réplication bactérienne dans les poumons de souris déficientes en IFNAR1, par rapport au type sauvage (40). Du moins, lors de l'infection de souris par le parasite intracellulaire *Leishmania major*, les IFN de type I produits sont essentiels à la génération de iNOS, qui limite la dissémination du pathogène. Des souris dépourvues de iNOS, ou dont les IFN ont été neutralisés, voient *L.major* proliférer de la peau et des ganglions lymphatiques vers le foie, la rate, la moelle osseuse et les poumons (51). Les effets des IFN dans la lutte contre les bactéries restent donc à explorer, ainsi que la régulation de leur induction suite à l'infection par différents types de procaryotes.

*Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli* sont deux espèces bactériennes fort répandues et dont certaines souches sont pathogènes pour l'être humain. La connaissance du rapport qu'ils entretiennent avec le système immunitaire inné peut être d'un grand apport thérapeutique.

#### **4.1) *Salmonella typhimurium***

*Salmonella typhimurium* est une bactérie flagellée, à GRAM-négatif, responsable d'intoxications alimentaires causant des gastroentérites chez plus de 500000 américains annuellement (41). Elle est transmise par l'ingestion de viande contaminée par des excréments, qui est insuffisamment lavée ou cuite. *S. typhimurium* infecte les cellules épithéliales et les macrophages du colon et de l'iléum, causant une érosion et de l'inflammation (41). Il s'agit d'une bactérie intracellulaire, dont la réplication se fait dans un organelle cytoplasmique unique, la *Salmonella-containing vacuole* (SCV), qui interagit avec le système endocytaire précoce, mais est capable d'éviter les endosomes tardifs ou prélysosomes, menant à la dégradation (231). Afin de pénétrer l'hôte, elle est capable d'induire l'endocytose chez des cellules non endocytiques (231).

Sa virulence est causée par une série de mécanismes aptes à déjouer le système immunitaire. Par exemple, elle est capable d'activer la sérine/thréonine kinase Akt, régulatrice de la survie cellulaire, dans le but d'empêcher l'apoptose de la cellule hôte (232). La bactérie aurait ainsi plus de temps pour se répliquer. Un complexe système permet à la bactérie une translocation à travers la membrane de la cellule hôte, avant sa pénétration, la protéine effectrice SigD, qui est essentielle à la phosphorylation et à l'activation d'Akt (232).

L'« injection » des protéines effectrices se fait à l'aide d'une structure, consommatrice d'ATP, nommée Système de sécrétion de type III (74). Il s'agit d'un complexe multiprotéique, essentiel à l'infection, capable de traverser, à l'image d'une seringue, la membrane eucaryote.

#### **4.2) *Escherichia coli***

Le pathogène intestinal intracellulaire humain *E.coli* entéropathogène (EPEC) cause des diarrhées par un mécanisme impliquant l'injection de protéines effectrices dans la cellule hôte (44). Par exemple, cette bactérie est capable de réarranger le cytosquelette de la cellule infectée et de faciliter son adhésion en insérant un récepteur pour sa protéine membranaire intimine, nommé TIR (translocated intimin receptor) (73). Le rôle précis de ce récepteur et les détails de son injection restent



cependant peu connus. Par contre, on sait que EPEC utilise des composantes d'un système de sécrétion de type III, semblable à celui de *S. typhimurium* (74, 73). Une autre molécule effectrice consiste en EspF, qui permet à EPEC de rompre l'intégrité des jonctions intimes (*tight junctions*) entre les cellules épithéliales intestinales et de permettre le mouvement paracellulaire des molécules, causant la diarrhée (44).

Les bactéries telles *E. coli* font partie intégrante de notre flore intestinale et sont normalement inoffensives et même utiles. Or, les cellules intestinales, exprimant des TLR, devraient réagir à leur présence. En effet, il a été observé que la reconnaissance de bactéries commensales par les TLR intestinaux était nécessaire au maintien de l'homéostasie intestinale et que la stimulation de TLR4 servirait à inhiber le développement d'allergies alimentaires (256). La présence de bactéries causerait, sans des mécanismes de tolérance, une inflammation continue : les cellules intestinales ont ainsi développé une hyposensibilité aux bactéries intestinales qui est en partie fonction du patron d'expression des TLR. Par exemple, on retrouve TLR5 sur le côté basolatéral, mais non apical des cellules épithéliales intestinales (77) ainsi que sur les cellules endothéliales sub-épithéliales (163). Ceci empêche son activation par des bactéries commensales telles *E.coli* mais non par des bactéries pathogènes traversant l'épithélium, telles *Salmonella*. La diminution de l'expression de TLR4 ne semble pas être responsable de la faible stimulation par le LPS des bactéries commensales, du moins pour les macrophages. Ce serait plutôt au niveau de la signalisation post-réceptorielle que l'adaptation se ferait : diminution de l'expression de IRAK1 et 4, augmentation de l'expression de IRAK-M dépourvue d'activité kinase, augmentation de l'expression des SOCS et de la sous-unité p50 de NF- $\kappa$ B, dont l'homodimérisation, contrairement à l'hétérodimérisation avec p65, aurait un effet répresseur (36).

Il est raisonnable de penser que, si l'organisme a développé une tolérance aux bactéries commensales, un mécanisme doit exister afin de signaler la présence de bactéries pathogènes. Ainsi, chez des macrophages IRF3<sup>-/-</sup>, l'apoptose en réponse à l'infection par la bactérie intracellulaire *Salmonella typhimurium* est fortement diminuée par rapport au type sauvage (120). Ce résultat suggère une activation d'IRF-3 par ce type bactérien.

## 5) Hypothèses

a) La relation entre l'adaptateur TRIF et les kinases TBK1 et IKK $\epsilon$ , ainsi que les mécanismes menant à l'activation de TRIF étant encore méconnus, nous avons, d'après les résultats illustrés à la figure 12 (215) émis l'hypothèse suivante : suite à la stimulation des TLR3 et TLR4, l'adaptateur TRIF est phosphorylé, induisant son activation et l'expression d'IFN de type I via le facteur de transcription IRF-3. Trois sérines sur la protéine ont fait l'objet de mutations en alanine, reproduisant l'absence de phosphorylation, ou en acide aspartique phosphomimétique. La modification, positive ou négative, de l'activité de promoteurs rapporteurs, sous contrôle des facteurs de transcription IRF-3 (ISG56), NF- $\kappa$ B (p2(2)TK) ou des deux (IFN- $\beta$ ) a été utilisée comme mesure de l'implication de la phosphorylation de chaque site dans la signalisation reliée à TRIF. La détermination des sites possibles de phosphorylation chez TRIF permettrait d'établir une meilleure relation structure-fonction chez cette protéine.

b) Les mécanismes par lesquels sont combattues les bactéries entéropathogènes *E. coli* et *S. typhimurium* étant toujours obscurs, nous avons, d'après l'observation que chez des macrophages, l'apoptose suite à l'infection par *S. typhimurium* était fortement diminuée chez des *knockout* IRF-3 (120), émis l'hypothèse suivante : l'infection de cellules épithéliales intestinales par les bactéries *E. coli* et *S. typhimurium*, induit l'activation d'IRF-3. Cette activation requiert un système de virulence bactérien, comprenant le système de sécrétion de type III, intact. Par migration sur gels d'acrylamide dénaturants ou non, permettant de détecter l'activation d'IRF-3 respectivement grâce à sa phosphorylation et à sa dimérisation, ainsi que par EMSA, permettant de déterminer la liaison de IRF-3 à un élément ISRE nucléotidique, la capacité des bactéries à induire ou empêcher l'activation de ce facteur de transcription a été évaluée. L'absence d'activation de IRF-3 permettrait d'envisager chez les bactéries des mécanismes de court-circuitage du système immunitaire, dont plusieurs exemples sont déjà connus et décrits plus bas (1, 42, 43, 67, 158, 232, 234).

c) Le facteur de transcription IRF-3 étant dégradé par un mécanisme impliquant le système ubiquitine/protéasome (154), suite à son activation prolongée, nous avons émis l'hypothèse suivante, sachant que les protéines hyperphosphorylées, telles IRF-3, étaient souvent ubiquitinées via une E3 ligase de type SCF (49) : suite à son activation prolongée, le facteur de transcription IRF-3 est ubiquitiné par un mécanisme impliquant une E3 ligase de type SCF. Cette ubiquitination est responsable de sa dégradation par le protéasome. La *F-box protein* Skp2, connue pour faire le lien entre le substrat et la machinerie d'ubiquitination dans plusieurs systèmes (30, 121, 135, 254) est considérée comme une candidate très plausible pour relier IRF-3 au reste de la E3 ligase. Les interactions possibles entre Skp2 et IRF-3 ont été mesurées *in vitro* : suite à un *pull down* ou une immunoprécipitation d'un des partenaires, un immunobuvardage a été réalisé dans le but de détecter la présence de l'autre. De plus, l'effet direct de Skp2 sur la stabilité de IRF-3 a été mesuré par détection, par immunobuvardage, de ce qui restait d'une quantité initiale donnée d'IRF-3, suite à la co-transfection de quantités croissantes de Skp2 dans des cellules Hek293. L'identification des conditions précises menant à la dégradation d'IRF-3 permettrait une meilleure compréhension des réglages fins de l'activité de ce facteur de transcription.

## MATERIEL ET METHODES

**MUTAGENESE DIRIGEE** Des mutants de TRIF S270A, S270D, S359A, S359D, S673A et S673D ont été réalisés en utilisant le kit QuickChange II (Stratagene, La Jolla, Californie, USA). Les oligonucléotides ont été produits par Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA. 10ng de canevas TRIF-pcDNA3.1+ on été utilisés, avec la polymérase PFU Ultra HF, pour une durée de 16 cycles, avec une température d'élongation de 68°C. Par la suite, le canevas non muté a été digéré avec 10U de DPN1. Les produits de mutagenèse (1µL) ont été transformés dans des bactéries supercompétentes XL1-Blue. Les mutations ont été confirmées par séquençage.

**Tableau I : Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée de TRIF**

Nom de l'amorce	Séquence
TRIF S270A fwd	AGG AGG TGG <u>G</u> GC GCT TGG CAG CTC TGG TGG
TRIF S270A rev	TGC CAA GCG <u>C</u> CC CAC CTC CTG GGC TTC CCG
TRIF S270D fwd	AGG AGG TGG <u>G</u> TG GCT TGG CAG CTC TGG TGG
TRIF S270D rev	TGC CAA GCG <u>A</u> CC CAC CTC CTG GGC TTC CCG
TRIF S359A fwd	AGG AGG <u>G</u> GC TGT TTC TGG GGT GGT GGG AGT AGG
TRIF S359A rev	CCA GAA ACA <u>G</u> CC CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT <u>T</u> CA TCT AC
TRIF S359D fwd	AGG AGG <u>G</u> TG TGT TTC TGG GGT GGT GGG AGT AGG
TRIF S359D rev	CCA GAA ACA <u>G</u> AC CCT CCT CCT CCT CCT CCT CCT <u>T</u> CA TCT AC
TRIF S673A fwd	AGC CCT GGG <u>G</u> CC TGA GGG GGT GCC GGT GAG
TRIF S673A rev	CCC CTC AGG <u>C</u> CC CAG GGC TGC AAC CCC TC
TRIF S673D fwd	AGC CCT GGG <u>T</u> CC TGA GGG GGT GCC GGT GAG
TRIF S673D rev	CCC CTC AGG <u>A</u> CC CAG GGC TGC AAC CCC TC

Le site des mutations a été souligné.

**TRAITEMENT DES CELLULES AU POLY(I :C)** Des cellules HEK293T ont été transfectées dans des plaques 24 puits, à l'aide de FuGENE 6 (Roche, Basel, Suisse) avec les quantités indiquées de TRIFwt, TRIFS270A, TRIFS359A ou TRIFS673A, avec 25ng de constructions rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteurs IFN $\beta$ , luc-ISG56 ou luc-p2(2)TK, ainsi qu'avec 2ng de pRL-TK et 250ng de TLR3. Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM high glucose (SIGMA-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA) 4mM glutamine, 10% FBS. 48h post-transfection, les cellules

ont été traitées pour la nuit, avec 0,1mg/mL de poly(I :C) préalablement morcelé par passage répété dans une aiguille de format 25G. Le lendemain, les cellules ont été congelées dans l'azote liquide/-80°C, jusqu'à la lyse dans 100µL de *Passive lysis buffer* 1X, Promega, Madison, WI, USA. Les mutants TRIFS270D, TRIFS359D ou TRIFS673D ont été transfectés et lysés de la même manière, sans être traités au poly(I :C).

**ESSAIS RAPPORTEURS LUCIFERASE** La lecture de la chimioluminescence a été réalisée à l'aide d'un luminomètre Berthold LB 9507. Le lysat cellulaire (10µL) a été mélangé à 50µL de réactif LARII, Promega, Madison, WI, USA, avant de prendre la mesure de la luminescence de la luciférase. Le réactif Stop&Glow, Promega, Madison, WI, USA, a ensuite été ajouté avant de prendre la mesure de la luminescence de Renilla. L'induction considérée est le rapport luciférase/Renilla.

**CULTURE DE *E.COLI* ENTEROPATHOGENES (EPEC)** Les bactéries *E.coli* entéropathogènes (EPEC) de souche E2348/69 et ΔTIR (Dr. Brett Finlay, Université de Colombie-Britannique, CB, Canada) ont été cultivées, à partir d'un stock glycérol conservé à -80°C, dans 3mL de LB, à 37°C, pour la nuit, sans agitation. Le lendemain, des cellules HeLa, ensemencées la veille dans des pétris de 60mm, ont été infectées avec 0,1mL de culture de EPEC par 10<sup>6</sup> cellules, dans 3mL de milieu DMEM low glucose, 10% FBS, pour les durées requises. Après 2 heures d'infection, 100µg/mL de gentamycine a été ajoutée. À la fin des infections, le milieu a été aspiré, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X, puis congelées à l'azote liquide/-80°C, jusqu'à la lyse. La lyse, qui a été aidée par 3 gels/dégels, a été réalisée avec 300 µL de tampon de lyse à EMSA (20mM HEPES pH 7,4, 100mM NaCl, 50mM NaF, 10mM β-glycérophosphate, 0,2% Triton X-100) ou de tampon de lyse conventionnel (50mM HCl, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 40mM β-glycérophosphate, 1% Triton X100 (v :v), 10% glycérol (v :v)), comprenant les inhibiteurs de protéases habituels (1µg/mL Pepstatine A, 2µg/mL Aprotinine, 1µg/mL Leupeptine, 0,2mM PMSF).

**CULTURE DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*** Les bactéries *S.typhimurium* de souche ΔssaR SL1344, SB103 x4370 ou SL 1344 wt (Dr. Brett Finlay, Université de

Colombie-Britannique, CB, Canada), ont été cultivées, partir d'un stock glycérol conservé à -80°C, dans 2mL de LB, 100µg/mL streptomycine, à 37°C, pour la nuit, avec agitation. Le lendemain, 300µL de la culture ont été inoculés à 10mL de LB seul, et incubés 3h, à 37°C, avec agitation. Des cellules HeLa, ensemencées la veille dans des pétris de 60mm, ont été infectées avec approximativement 90 bactéries par cellule HeLa, dans 3mL de milieu DMEM low glucose, 10% FBS, 50µg/mL de gentamycine, pour les durées requises. Après 2 heures, le milieu a été changé et la concentration de gentamycine diminuée à 5µg/mL. À la fin des infections, le milieu a été aspiré, les cellules ont été rincées 2 fois avec du PBS 1X, puis congelées à l'azote liquide/-80°C, jusqu'à la lyse. La lyse, qui a été aidée par 3 freeze/thaw, a été réalisée avec 300 µL de tampon de lyse à EMSA ou de tampon de lyse conventionnel, comprenant les inhibiteurs de protéases habituels (voir section précédente).

**GELS D'ACRYLAMIDE NATIFS** Les échantillons (30µg) ont été migrés environ 50 minutes à 25mA, sur gel de polyacrylamide non dénaturant 7,5%, après avoir été mélangés à du tampon de chargement 2X (125mM Tris pH 6,8, 30% glycérol, bleu de bromophénol). Le tampon de migration de la chambre supérieure était composé de 25mM Tris pH 8,4, 192mM glycine, 0,2% déoxycholate de sodium, alors que le tampon de la chambre inférieure était identique, exception faite du déoxycholate de sodium. Avant la migration, une pré-migration de 30 minutes à 40mA a été réalisée. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose, à 100V, durant 1 heure, dans du tampon de transfert avec méthanol (14,4g/L, TRIS 3g/L, 20% méthanol (v:v)).

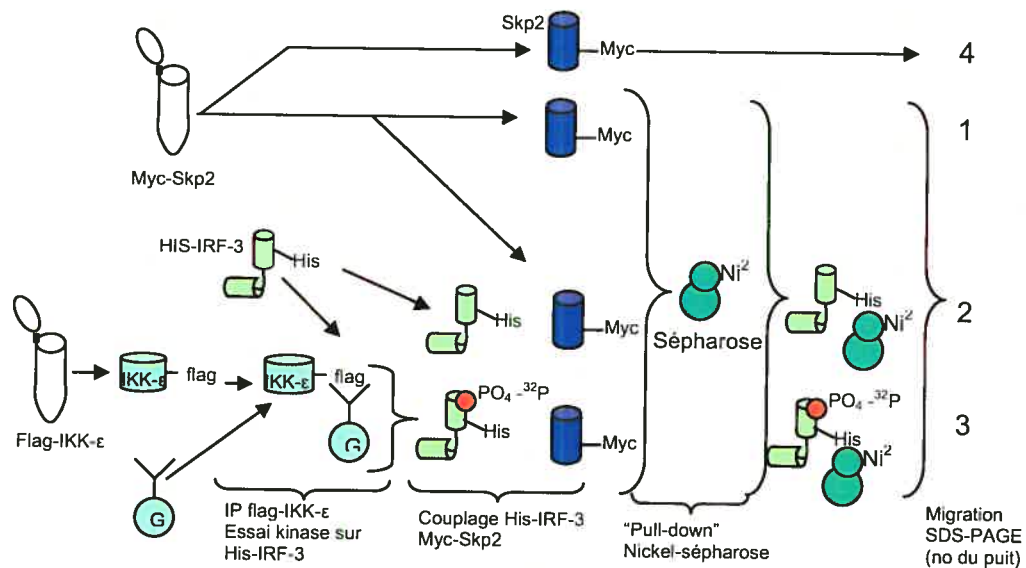
**GELS D'ACRYLAMIDE DENATURANTS** Les échantillons (40µg) ont été migrés sur gel SDS-PAGE 7,5%, 200V, environ 45 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose, à 100V, durant 2 heures, dans du tampon de transfert avec méthanol (voir section précédente).

**EMSA** L'induction de l'activité de IRF-3 a été détectée par sa liaison à l'élément ISRE de l'IL-15 (154), observée par EMSA. La sonde a été produite avec 20ng de d'ADN codant pour ISG15 (20ng/µL), 5µL d'EXCHANGE buffer (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède), 5 µL de  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (10 µCi/ µL), 0,5 µL de T4

polynucléotide kinase (10U/  $\mu$ L) (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède), 13,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, incubés 30 minutes à 37°C à 500rpm. La réaction a été arrêtée avec 25  $\mu$ L de TE et la sonde purifiée sur colonne G-25, puis dosée au compteur bêta. La réaction de EMSA a été réalisée avec 5  $\mu$ g d'extrait cellulaire, 2  $\mu$ g de poly(dI:dC) préalablement dénaturé à 45°C durant 5 minutes, 5  $\mu$ L de WCE 5X (100mM HEPES pH 7,0, 200mM KCl, 100mM NaCl, 50mM NaF, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM  $\beta$ -glycérophosphate, 2,5mM DTT, 0,5mM EDTA, 20% (m/v) Ficoll 400, 0,4% (v/v) Triton X-100), 200 000cpm de sonde radiomarquée, complétés à 25 $\mu$ L avec de l'eau. La réaction a été incubée 5 minutes à 15°C à 500rpm et arrêtée avec 7 $\mu$ L de bleu de bromophénol. Pour l'essai supershift, la réaction, exceptée la sonde, a été auparavant traitée 15 minutes sur glace avec 1 $\mu$ g d'anticorps IRF-3 FL-425 10X (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca., USA.). Les échantillons ont été migrés sur un gel d'acrylamide 6%, avec du tampon TBE 0,25X, durant environ 4h, à 123V. Avant la migration des échantillons, le gel a été soumis 1h à une tension de 150V afin de l'équilibrer. Après la migration, le gel a été séché sous vide à 80°C durant 3h. Les résultats ont été révélés sur une cassette d'exposition lue par un appareil Typhoon (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède).

**PRODUCTION DE SKP2, IKK $\epsilon$  ET IRF-3 *IN VITRO*, IMMUNOPRECIPITATION, ESSAI KINASE ET COUPLAGE *IN VITRO*** Une protéine chimérique His-IRF-3 (épitope composé de résidus histidine répétés, greffé à l'extrémité de IRF-3), a été produite dans un système bactérien (pET expression systems, Novagen) et purifiée sur colonnes de nickel (trousse de purification His·Bind, Novagen). Myc-Skp2 et flag-IKK $\epsilon$  ont été produit *in vitro*, à l'aide de la trousse TnT<sup>®</sup> Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega, Madison, WI, USA) (Figure 18). Les réactions (2 $\mu$ g canevas ADN, 40 $\mu$ L réticulocyte, 1mM méthionine, complété à 50 $\mu$ L avec de l'eau) ont été incubées 90 minutes à 30°C. Des billes protéine G/sépharose ont été couplées 90 minutes avec un anticorps flag, puis, flag-IKK $\epsilon$  a été immunoprécipité, 4h, à 4°C. Après 3 lavages au tampon de lyse et 1 lavage au tampon kinase 1X (pour le 2X : 100mM Hepes pH 7,4, 40mM MgCl<sub>2</sub>, 4mM DTT), un essai kinase a été réalisé sur 5 $\mu$ g de His-IRF-3 : sur les billes couplées à flag-IKK $\epsilon$ , on a déposé 20 $\mu$ L de tampon kinase 2X, 5 $\mu$ g (10 $\mu$ L) de His-IRF-3 et 10 $\mu$ L de mélange ATP (2 $\mu$ L de  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP (10  $\mu$ Ci/  $\mu$ L), 0,45  $\mu$ L d'ATP froid, et 7 $\mu$ L

d'eau), puis, la réaction a été incubée 45 minutes à 30°C, à 600rpm. Dans la condition « froide », le  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP a été supprimé. Le surnageant de l'essai kinase (40µL) a été couplé avec le produit de traduction *in vitro* de Myc-Skp2, dans du tampon de lyse, durant 1h30, à 30°C. Des billes de nickel/sépharose ont été chargées à l'aide des tampons appropriés (kit de purification His·Bind, Novagen), puis, les réactions de couplage y ont été ajoutés, pour une durée de 1h, à 4°C, avec rotation. Après 5 lavages 0,5% IGEPAL/PBS, les billes ont été asséchées et 20µL de tampon de chargement 2X ont été ajoutés, avant de dénaturer les échantillons 5 minutes à 95°C et de faire migrer sur un gel SDS-PAGE 12% (figure 18).



**Figure 18: Représentation schématique de la production *in vitro* de Myc-Skp2 et flag-IKK-ε, de l'essai kinase par flag-IKK-ε sur His-IRF-3, du couplage de His-IRF-3 avec Myc-Skp2 et du « pull-down » nickel-sépharose sur His-IRF-3.** La kinase flag-IKK-ε et la protéine à F-box Myc-Skp2 ont été produits *in vitro* (à gauche). La kinase flag-IKK-ε, après son couplage à des billes/protéine G couplées à un anticorps anti-flag, a servi à un essai kinase sur His-IRF-3, avec pour substrat, de l'ATP radiomarqué ( $\gamma^{32}\text{P}$  ATP). Le produit de l'essai kinase, His-IRF-3 phosphorylé (cercle rouge)(ligne 3) ainsi que de His-IRF-3 non-phosphorylé en C-terminal (ligne 2), ont été couplés avec Myc-Skp2. Les mélanges réactionnels, ainsi que Myc-Skp2 non couplé à His-IRF-3 (contrôle négatif, ligne 1), ont ensuite été incubés avec des billes nickel-sépharose. Sur un gel SDS-PAGE 12% ont été déposés les produits des « pull-down » nickel-sépharose (lignes 1, 2, 3) et le produit de la réaction *in vitro* Myc-Skp2 (ligne 4). Les numéros de puit (à droite) font référence à la figure 26.



### **TRANSFECTION DE SKP2 ET IRF-3, MIGRATION SUR SDS-PAGE ET REVELATION**

Dans le but de voir l'effet de Skp2 sur la demi-vie de IRF-3, les vecteurs pcDNA3.1+ contenant ces deux constructions ont été transfectés dans des cellules Hek293T, à l'aide de CaPO<sub>4</sub>/HeBS. Après 6h de transfection, le milieu (DMEM high glucose, SIGMA-Aldrich, St-Louis, Missouri, USA, 4mM glutamine, 10% FBS) a été changé, et les cellules ont été laissées 36h à 37°C, afin de les laisser exprimer les protéines. Ensuite, les cellules ont été traitées 4h au cycloheximide (1µg/µL), puis congelées à l'azote liquide. Après une lyse dans du tampon de lyse conventionnel, les échantillons (40µg) ont été migrés sur gel SDS-PAGE 10%, à 45mA, transférés sur membrane de PVDF (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède), et visualisés par immunobuvardage à l'aide d'anticorps anti-flag révélé par chimioluminescence, à l'aide de ECL+ (Amersham Biosciences, Uppsala, Suède).

## RESULTATS

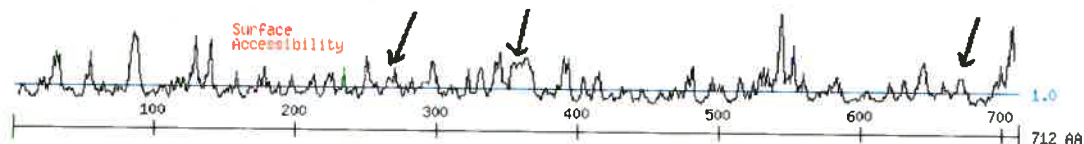
### Il existe trois sites à forte probabilité de phosphorylation sur l'adaptateur TRIF

Dans le but de déterminer si l'adaptateur TRIF était phosphorylé, nous avons, dans un premier temps, soumis sa séquence protéique (numéro d'accès à NCBI NM\_182919) à l'algorithme disponible sur le site internet Scansite (<http://scansite.mit.edu/>). Cet outil donne un indice des sites potentiellement phosphorylables sur une protéine, ainsi que les probabilités qu'ils le soient. La soumission de la séquence a donné une cinquantaine de résultats, parmi lesquels trois sérines se démarquaient (figure 19).

a

Sites <i>Proline-directed</i>			
P38 kinase			
Site	Score	Séquence	SA
S270	0,1039	SPPELPSSPPPGLPE	2.353
S359	0,1455	TPTTPETSPPPPPPP	2.838
S673	0,0600	ASPAPPQSPGLQPLI	1.038

b



**Figure 19 : Sites prédits de phosphorylation de IRF-3 et leur accessibilité.** La séquence protéique de TRIF a été soumise à l'algorithme Scansite, qui permet de prédire les sites de phosphorylation potentiels d'une protéine, à haute stringence, c'est-à-dire en ne considérant que les sites correspondant fortement à des cibles connues de kinases. En (a) sont présentés les scores associés à trois sites sur TRIF, S270, S359 et S673, et reflétant leur probabilité de phosphorylation, ainsi que le contexte d'acide aminés des sites et l'accessibilité du solvant. À remarquer est la présence d'une proline suivant immédiatement la sérine potentiellement phosphoacceptrice, signe d'un site *proline-directed*. En (b) est présentée l'accessibilité du site en fonction de sa localisation à l'intérieur ou à l'extérieur de la protéine.

Les résultats (« scores ») possibles varient de 0 à l'infini, où 0 signifie une concordance parfaite. La séquence fait référence au contexte d'acides aminés autour du potentiel site de phosphorylation. La dernière colonne indique l'accessibilité du

solvant (SA) à cette position, c'est-à-dire, si le site se trouve dans une cavité hydrophobe ou caché à l'intérieur de la structure secondaire de la protéine. Les trois sites retenus l'ont été pour leur faible score et leur accessibilité (Figure 19 a, colonne de droite, b) : S270, S359 et S673. Le site S673 possède le score le plus faible ; de plus, il est situé dans le domaine RHIM (*RIP homotypic interaction motif*) nouvellement découvert, permettant l'interaction avec la kinase RIP-1 (174), soulevant l'idée que la phosphorylation de ce site soit impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B via TRIF. La kinase proposée était la p38 kinase, qui reconnaît des sites *proline-directed*.

De tels sites, reconnus également par des kinases comme ERK2, sont caractérisés par un résidu proline suivant une sérine/thréonine. Ils sont parmi les meilleurs repères permettant de détecter le substrat potentiel d'une MAP-kinase (195). La présence d'une proline suivant la sérine/thréonine permet un meilleur positionnement de la kinase, puisque la chaîne latérale de cet acide aminé est orientée de façon à ne pas nuire à l'interaction (195). Ainsi, dans certains cas, le site accepteur de phosphate est suivi d'une glycine, dépourvue de chaîne latérale, plutôt que d'une proline.

Nous avons donc généré, par mutagenèse dirigée, des mutants TRIF pour les trois sites étudiés. La substitution de la sérine par une alanine, dont la chaîne latérale ne peut être phosphorylée, doit permettre de détecter, si un site donné est important, une modification positive ou négative de l'activation de TRIF en réponse à sa stimulation, par rapport au type sauvage. En effet, il n'est pas connu si la phosphorylation des trois sites mis en évidence aurait un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activité de TRIF. Ces trois mutants sont désignés S270A, S359A et S673A. La substitution de la sérine par un acide aspartique, dont la chaîne latérale chargée mime l'effet d'une phosphorylation, doit permettre d'obtenir, pour un site important, une activation constitutive ou une perte d'activité de TRIF. Ces mutants sont désignés S270D, S359D et S673D. Les mutants ont été confirmés par séquençage.

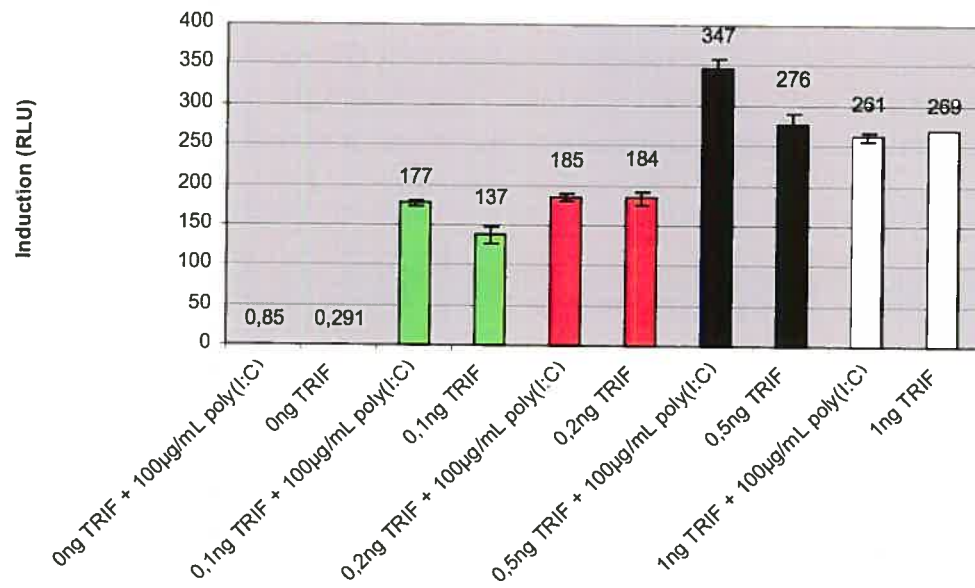
### **Détermination des quantités de TRIF à transfecter afin d'obtenir une bonne induction des rapporteurs par le poly(I :C)**

Afin de déterminer si la phosphorylation de TRIF aux sites déterminés précédemment avait un effet sur son activité, c'est-à-dire sur sa capacité à induire les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3, nous avons réalisé des essais rapporteurs

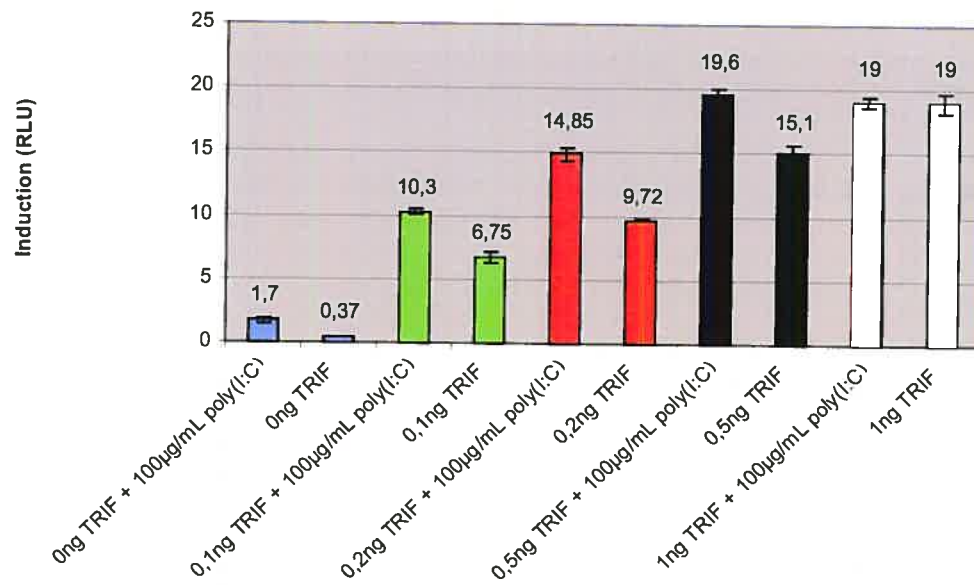
luciférase. Le gène codant pour la protéine luciférase chimioluminescente, est, dans ces essais, sous contrôle d'un promoteur dont l'induction est modulée par la voie de signalisation étudiée. Dans notre cas, les promoteurs utilisés sont celui de l'interféron  $\beta$  (induit par IRF-3 et NF- $\kappa$ B), ISG56 (induit par IRF-3), ou p2(2)TK (induit par NF- $\kappa$ B). Il est ainsi possible de détecter une activation des deux facteurs de transcription émanant de TRIF. Les gènes rapporteurs, ainsi que TRIF et TLR3, sont transfectés dans des cellules HEK293T, choisies pour leur aisance à transfecter, ainsi que pour leur absence d'expression de TLR. En effet, en n'utilisant que TLR3 transfecté, est ainsi exclue une activation de NF- $\kappa$ B ou IRF-3 par d'autres TLR, ce qui limite l'interférence et le « bruit de fond ».

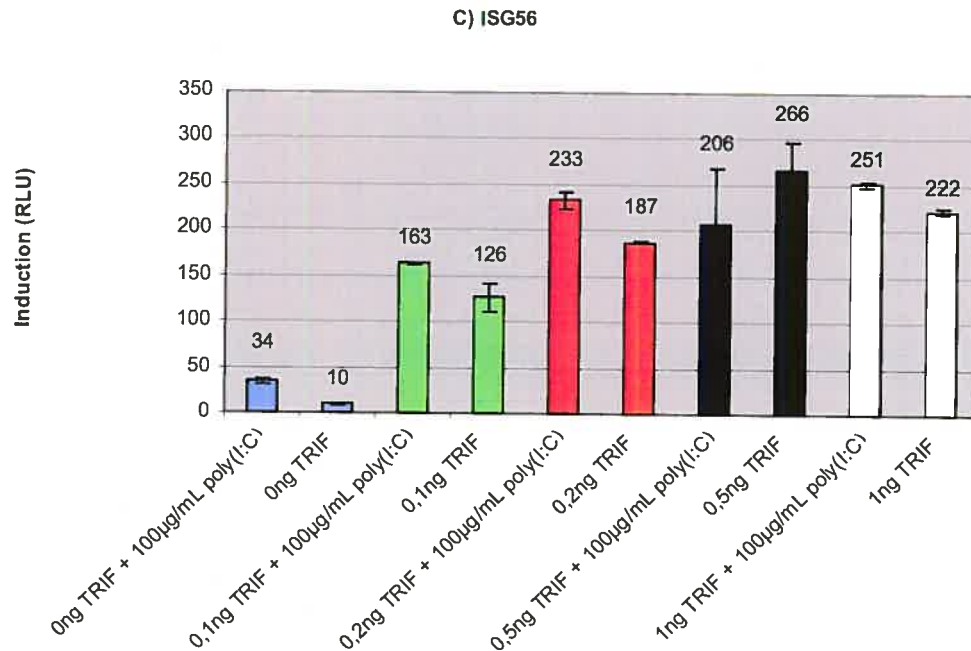
Pour les mutants sérine/alanine, le but est de mesurer la perte ou l'augmentation d'induction des gènes rapporteurs, en réponse au ligand de TLR3, le poly(I :C). Cependant, la simple transfection de TRIF dans les HEK293T suffisant à induire les gènes rapporteurs, nous avons dû réaliser une courbe dose-réponse au poly(I :C), en fonction de différentes quantités de TRIFwt transfectées. A partir de 50ng de TRIF (résultats non montrés), nous avons graduellement diminué la quantité transfectée, pour obtenir l'induction par le poly(I :C) des rapporteurs la plus forte et facilement observable. La figure 20 montre que pour les trois rapporteurs, luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b), la meilleure induction de la luminescence, par rapport au niveau basal (non-stimulé), a été obtenue avec 0,1ng de TRIF : respectivement 1,29 fois, 1,29 fois et 1,53 fois plus fortement. Lorsqu'il est question d'induction des rapporteurs, le résultat est obtenu en divisant la luminescence mesurée dans la condition stimulée au poly(I :C) par celle obtenue en absence de stimulation. La quantité de TRIF optimale, qui sera utilisée par la suite pour les essais rapporteurs, a ainsi été fixée à 0,1ng. Pour des quantités plus grandes de TRIF, soit la réponse au poly(I :C) était faible, soit celle-ci était très variable (Figure 20c, voir 0,5ng TRIF).

A) IFN $\beta$



B) p2(2)TK





**Figure 20: Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron- $\beta$ , ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la stimulation par diverses quantités de poly(I :C).** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les quantités indiquées sous l'axe des x de TRIF, avec 25ng de constructions rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteur luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b), ainsi qu'avec 2ng de pRL-TK et 250ng de TLR3. Après 48h de transfection, les cellules ont été traitées pour la nuit, avec 0,1mg/mL de poly(I :C) préalablement morcelé par passage répété dans une aiguille de format 25G. La mesure de l'activité des gènes rapporteurs a ensuite été réalisée. La stimulation par le poly(I :C) a induit les trois rapporteurs, même en absence de TRIF transfecté. La meilleure induction a été obtenue, respectivement de 1,29 fois, 1,29 fois et 1,53 fois le niveau de luminescence basal, pour les rapporteurs luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b), avec la transfection de 0,1ng de TRIF.

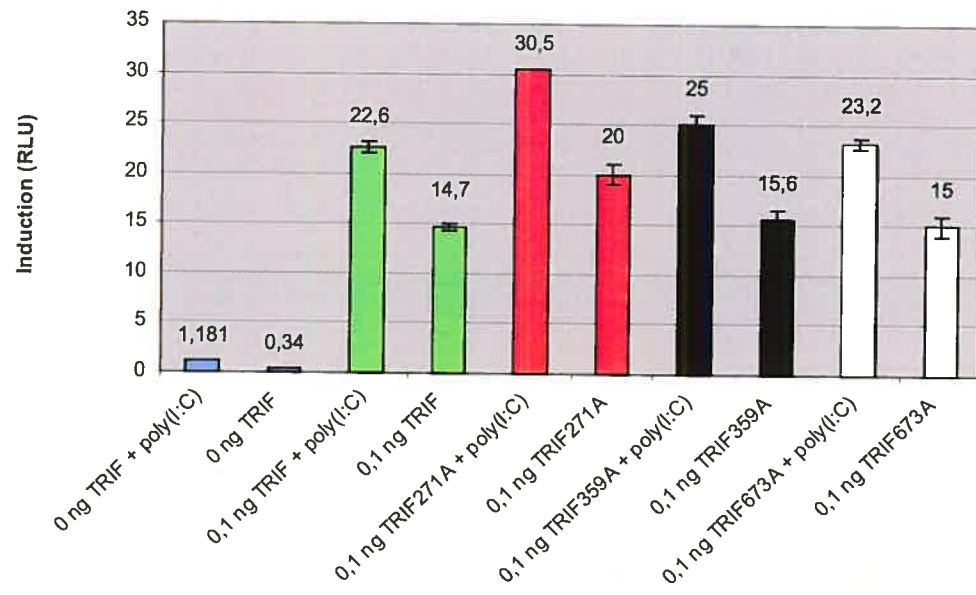
### **Les mutants TRIF Ser/Ala ne confèrent pas une perte de réponse de TRIF au poly(I :C)**

La quantité optimale de TRIF à transfecter déterminée, nous avons étudié l'effet des mutations Ser/Ala sur la capacité de TRIF à induire les trois gènes rapporteurs, en réponse au poly(I :C), par rapport au type sauvage. La stimulation de cellules n'ayant pas été transfectées avec TRIF produit, dans tous les cas, une induction plus forte des gènes rapporteurs, par rapport aux cellules non stimulées (induction des rapporteurs luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b) respectivement de 3,47 fois, 3,97 fois et 4,86 fois), que dans les conditions où TRIF a

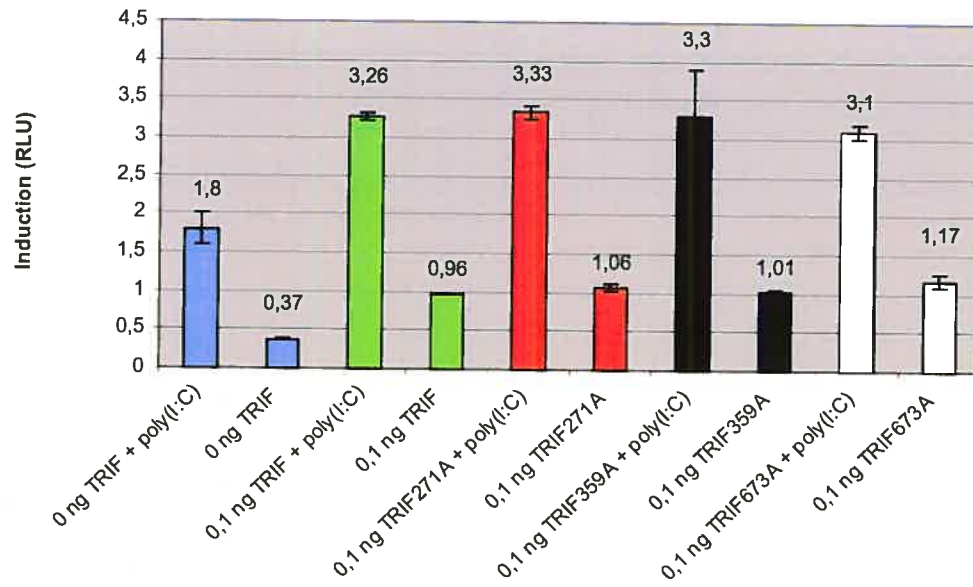
été transfecté (figure 21). Ceci indique la présence de TRIF endogène chez ces cellules et que la transfection, même de quantité infime de TRIF, fait perdre de la sensibilité au système en induisant une luminescence basale, sans stimulation au poly(I :C) masquant en partie l'effet de ce dernier. Par exemple, pour le rapporteur luc-IFN- $\beta$  (figure 21a) il y a une induction de 3,47 fois de la luminescence par le poly(I :C) en absence de TRIF transfecté (bleu), alors que la surexpression de TRIF diminue cette induction à 1,53 fois (vert). Cependant, cette condition donne le niveau d'induction de la luminescence auquel on devrait s'attendre dans le cas où la mutation ferait perdre toute activité au TRIF transfecté. La figure 21 montre que la transfection de mutants TRIF271A, TRIF359A ou TRIF 673A pour les rapporteurs luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b) a produit une induction de la luminescence par le poly(I :C) ne différant pas significativement de celle obtenue lors de la transfection de TRIF sauvage, soit environ respectivement 1,54 fois, 1,55 fois et 3,40 fois, en comparant, pour les trois rapporteurs les barres rouges, noires et blanches aux barres vertes.

Ainsi, une mutation des sérines 271, 359 et 673 en alanine, dans le but d'empêcher la phosphorylation, ne module pas la réponse de gènes répondant à l'activation de TRIF. Ceci signifie que l'impossibilité pour TRIF d'être phosphorylé sur ces trois sites ne modifie pas sa capacité à induire la transcription génique par des voies passant par NF- $\kappa$ B ou IRF-3.

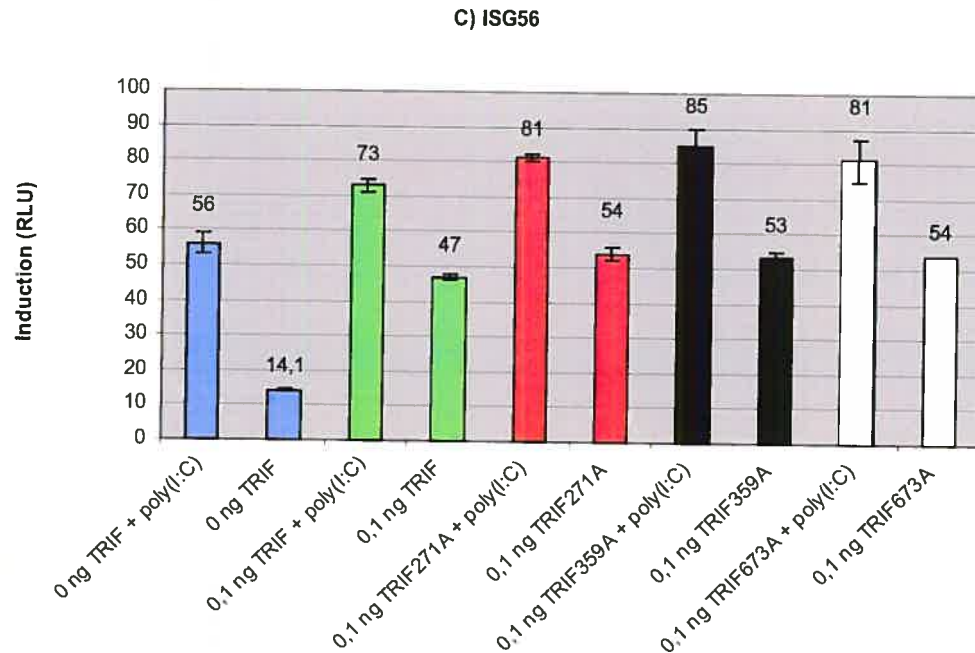
A) IFNB



B) p2(2)TK





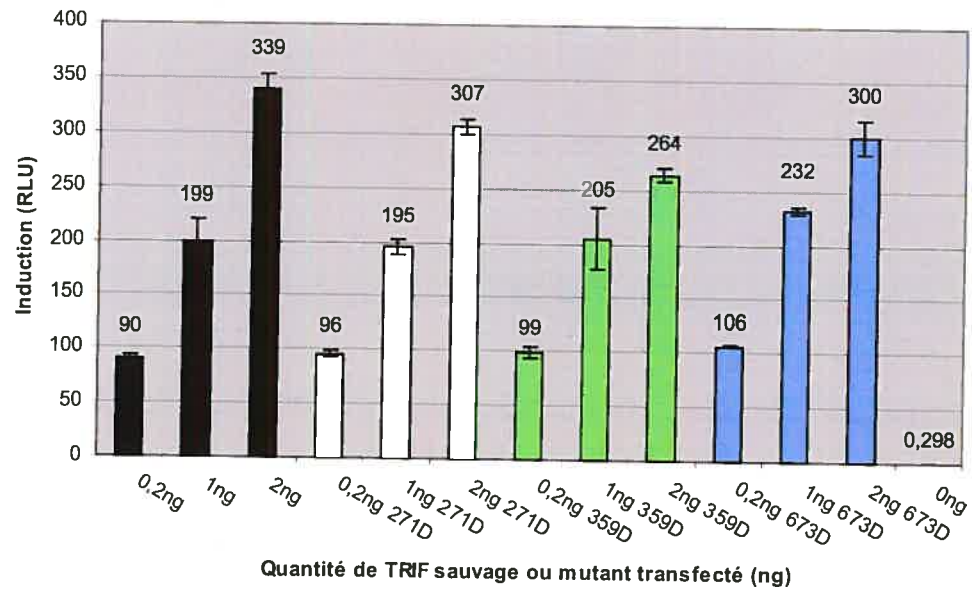


**Figure 21: Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron  $\beta$ , ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la stimulation par 0,1ng de poly(I :C), suite à la transfection de mutants TRIF S270A, S359A et S673A.** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec 0,1ng de TRIFwt (en vert), TRIF271A (en rouge), TRIF359A (noir), ou TRIF673A (blanc), avec 25ng de constructions rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteur luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b), ainsi qu'avec 2ng de pRL-TK et 250ng de TLR3. Le contrôle négatif (en bleu) a été transfecté avec toutes les constructions sauf TRIF. Après 48h de transfection, les cellules ont été traitées pour la nuit, avec 0,1mg/mL de poly(I :C) préalablement morcelé par passage répété dans une aiguille de format 25G. La mesure de l'activité des gènes rapporteurs a ensuite été réalisée. En absence de TRIF surexprimé, le poly(I :C) a augmenté la luminescence des rapporteurs luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b) respectivement de 3,47 fois, 3,97 fois et 4,86 fois. La transfection de mutants TRIF271A (rouge), TRIF359A (noir) ou TRIF 673A (blanc) pour les rapporteurs luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b) produit un niveau d'induction de la luminescence ne différant pas significativement de celle obtenue par la transfection de TRIF sauvage (vert).

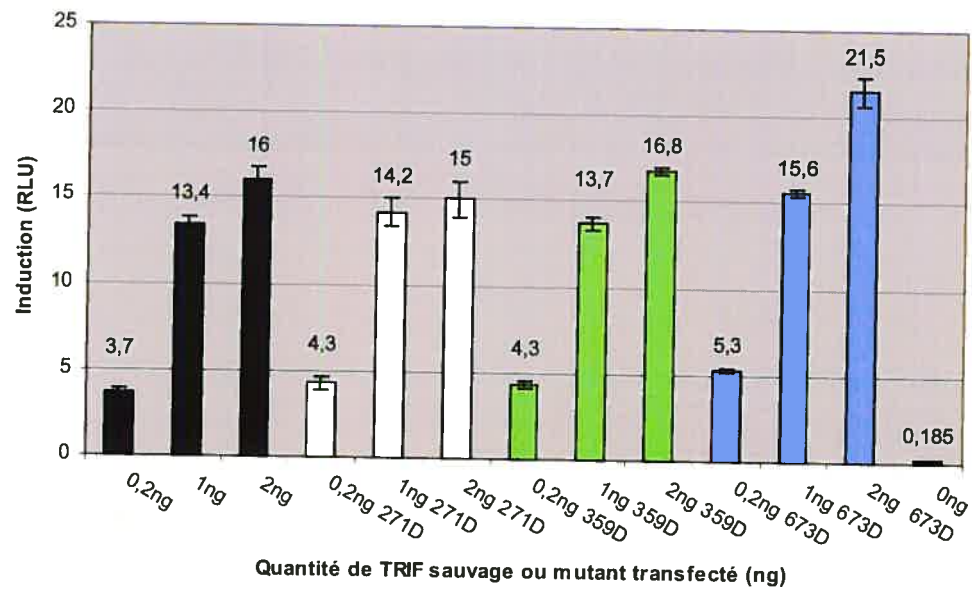
### **La mutation des Ser 271, 359 et 673 en Asp chez TRIF ne module pas sa capacité à induire des gènes rapporteurs contrôlés par NF- $\kappa$ B et IRF-3**

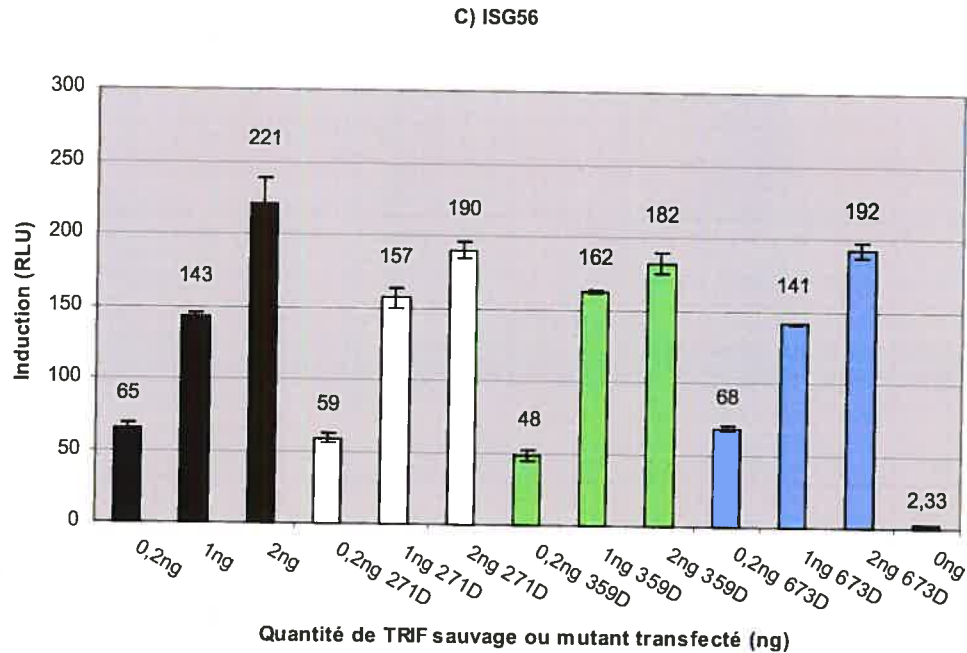
La modification de l'induction des gènes rapporteurs par la surexpression des mutants phosphomimétiques, en absence de stimulation au poly(I:C), par rapport au type sauvage devrait être le reflet de l'importance de la phosphorylation des sites mutés dans la signalisation via TRIF. Les cas de régulation négative ou positive de l'activité des promoteurs par les mutations sont également envisageables. Pour différentes quantités de mutants phosphomimétiques TRIF, nous avons donc comparé la capacité à induire les gènes rapporteurs, par rapport au TRIFwt. La figure 22 montre que les mutations phosphomimétiques engendrent une induction des gènes rapporteurs, proportionnelle à la quantité de TRIF transfectée, comparable à celle obtenue chez le type sauvage. En effet, pour le rapporteur luc-IFN- $\beta$  (figure 22 a), la transfection de 0,2ng, 1ng et 2ng de TRIF induit des niveaux de luminescence de 90, 199 et 339 RLU (en noir), comparativement à 0,298 en absence de TRIF (à droite). En comparaison, les mutants TRIF S271D, S359D et S673D induisent, pour les mêmes quantités transfectées, des niveaux de luminescence respectivement de 96, 195, 307 RLU (blanc), 99, 205, 264 RLU (vert) et 106, 232, 300 RLU (bleu). Des résultats similaires sont obtenus pour les rapporteurs luc-p2(2)TK (figure 22 b) et luc-ISG56 (figure 22 c). Ces données indiquent que la phosphorylation de ces sites ne suffit pas à doter TRIF d'une capacité accrue à activer ou inhiber les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et IRF-3.

A) IFNB



B) p2(2)TK





**Figure 22: Induction de gènes rapporteurs luciférase, sous contrôle des promoteurs l'interféron  $\beta$ , ISG56, ou p2(2)TK en réponse à la transfection de différentes quantités de TRIF S270D, S359D et S673D.** Des cellules HEK293T ont été transfectées avec les quantités indiquées sous l'axe des x de TRIFwt (en noir), TRIF271D (en blanc), TRIF359D (en vert), ou TRIF673D (en bleu), avec 25ng de constructions rapporteurs luciférase sous contrôle des promoteur luc-IFN $\beta$  (a), luc-ISG56 (c) ou luc-p2(2)TK (b), ainsi qu'avec 2ng de pRL-TK et 250ng de TLR3. Le contrôle négatif (à droite) a été transfecté avec toutes les constructions sauf TRIF. La mesure de la luminescence a été réalisée 48h post-transfection. La surexpression de quantités croissantes de TRIF, 0,2ng, 1ng et 2ng, a induit proportionnellement une induction de l'activité luciférase des rapporteurs (noir). La transfection des mutants TRIF S271D (blanc), S359D (vert) et S673D (bleu) a causé l'induction des rapporteurs d'une façon ne différant pas significativement de celle induite par TRIF sauvage (noir). Pour le rapporteur luc-IFN- $\beta$  (a), l'augmentation d'un facteur 10 de la quantité de TRIF transfecté a augmenté la luminescence de 3,76 fois pour le type sauvage (noir), 3,19 fois pour S271A (blanc), 2,67 fois pour S359D (vert) et 2,83 fois pour S673D (bleu). Les rapporteurs p2(2)TK (b) et ISG56 (c) ont produit des résultats similaires.

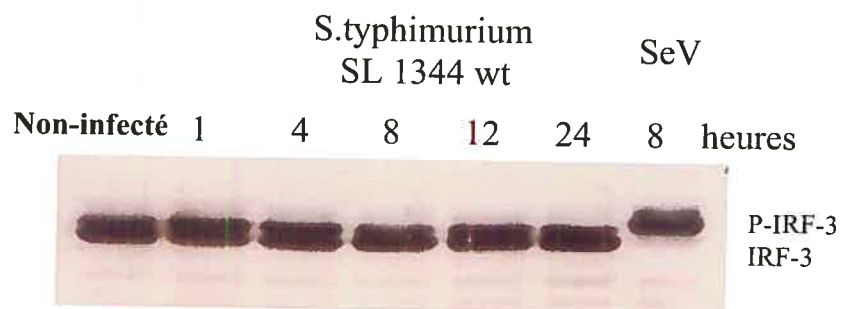
### Les bactéries *Salmonella typhimurium* n'activent pas IRF-3

Comme les bactéries à Gram négatif *S.typhimurium* induisent l'apoptose chez des macrophages, conditionnellement à l'expression de IRF-3 par ces cellules, nous avons voulu savoir si ces procaryotes pathogènes activaient ce facteur de transcription. Ces bactéries sont souvent étudiées comme modèle à l'invasion bactérienne, vu leur facilité à cultiver, à manipuler génétiquement, et à infecter des cellules épithéliales en culture (231). Nous avons donc utilisé comme modèle cellulaire des cellules épithéliales de type HeLa. Nos outils bactériens comprenaient, outre la souche sauvage SL 1344, les souches  $\Delta$ ssaR SL1344, affublées d'une mutation dans le composant ssaR du système de sécrétion les rendant incapables de former des SCV (25), et SB103 x4370, possédant un défaut dans une protéine inconnue de 54kDa, codée dans le plasmide de virulence et responsable de l'adhérence à la cellule hôte (71). Il est ainsi possible de distinguer si une possible activation d'IRF-3 nécessite les étapes d'adhérence de la bactérie à la cellule hôte et d'injection des protéines de virulence.

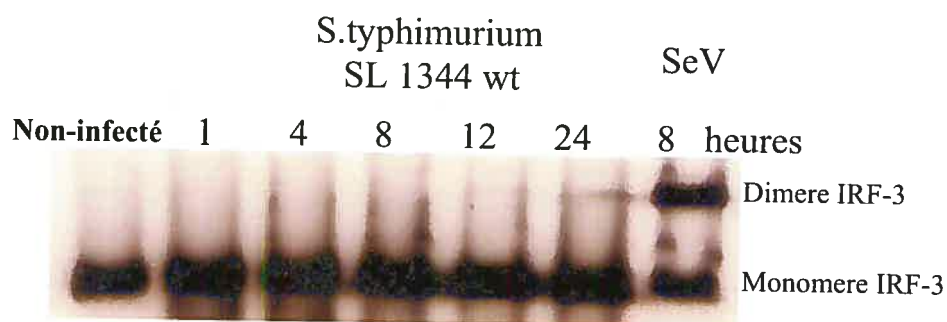
Suite à l'infection des cellules, l'activation de IRF-3 a été mesurée, par la migration sur un gel d'acrylamide non dénaturant, un gel SDS-PAGE, ou par un EMSA (*Electrophoretic-mobility shift assay*). Cette dernière technique détecte la liaison d'un IRF-3 activé à un élément de réponse nucléotidique radiomarqué, dans notre cas l'élément ISRE de l'IL-15. La migration sur gel d'acrylamide non-dénaturant permet de visualiser la radioactivité associée à l'ADN lié à IRF-3. La liaison d'un anticorps neutralisant (anti-IRF-3) au contrôle positif du EMSA, abolissant l'interaction sonde/IRF-3, permet de déterminer, parmi toutes les bandes obtenues, celle correspondant au signal recherché. Sur gel SDS-PAGE, la phosphorylation d'IRF-3 (en C-terminal) est détectée, lors d'un immunobuvardage, par un retard sur gel (formes III et IV) par rapport aux formes I et II (220). Sur un gel natif, c'est la dimérisation du facteur de transcription qui est détectée, par immunobuvardage, également par sa migration plus lente par rapport au monomère. Le contrôle positif consiste en une infection par le virus de Sendaï, dont la capacité d'activation de IRF-3 est connue (154). La figure 23 montre, par gel d'acrylamide natifs ou par SDS-PAGE que l'infection de HeLa par *S.typhimurium* SL 1344wt (a, b),  $\Delta$ ssaR SL1344 (c, d) ou SB103 x4370 (e, f) n'induit ni la phosphorylation en C-terminal, ni la dimérisation d'IRF-3. La figure 25b montre, cette fois par EMSA,

qu'après infection par la souche SL 1344wt, le facteur de transcription IRF-3 ne lie pas de façon détectable l'ADN.

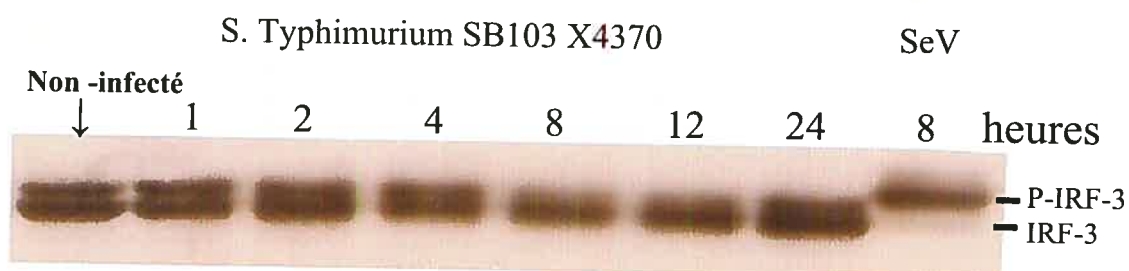
**a**



**b**



**c**



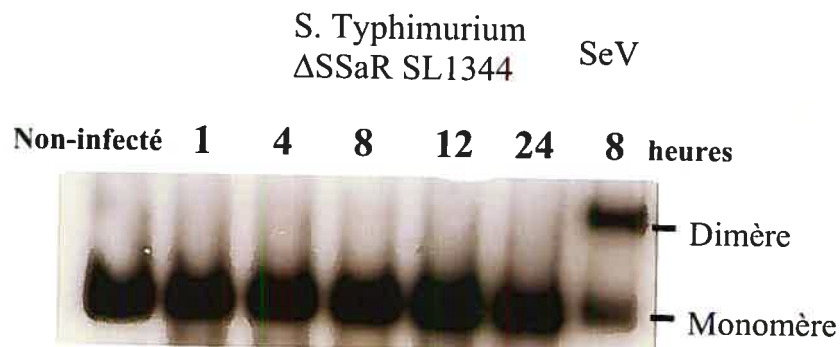
d



e



f



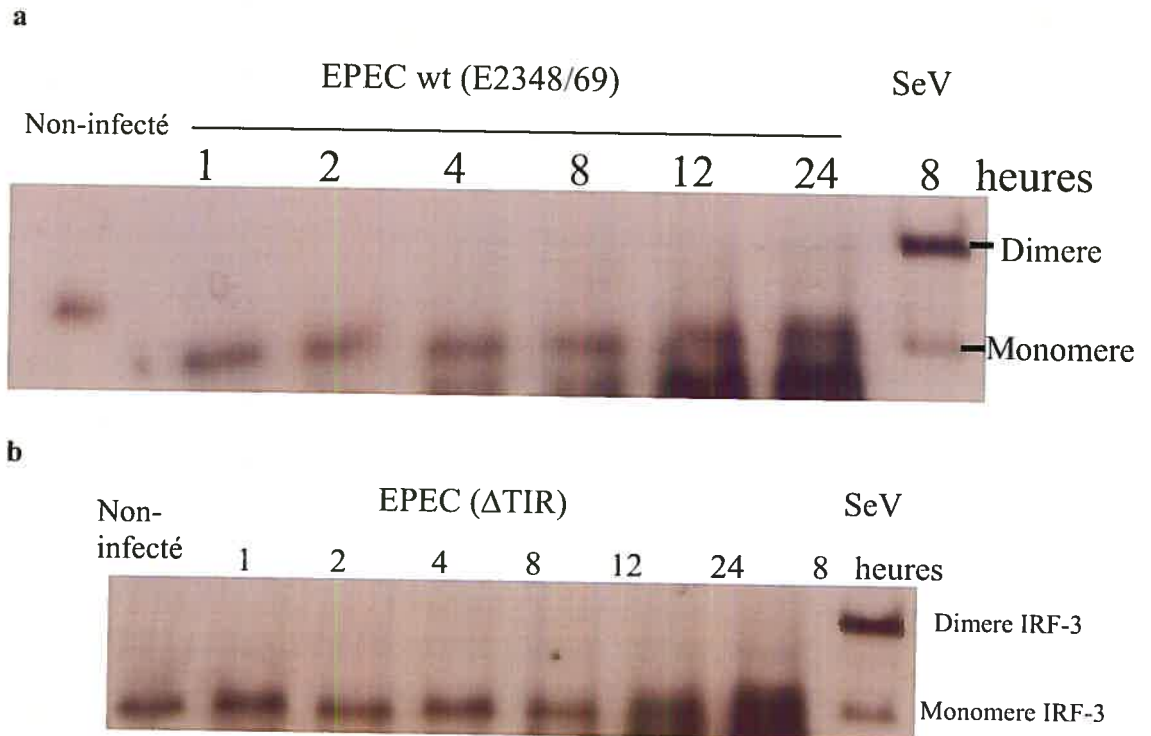
**Figure 23: S.typhimurium n'active pas IRF-3 chez des cellules HeLa.** Des cellules HEK293T ont été infectées par des bactéries S.typhimurim (MOI= 100) de souche sauvage (a, b), SB103 X4370 (c, d), ou ΔSSaR SL1344 (e, f) pour les durées indiquées ou par le contrôle Sendaï Virus (100HAU/10<sup>6</sup> cellules). Les infections ont été faites dans du milieu contenant 50μg/mL de gentamycine pour les 2 premières heures, avant de descendre la concentration d'antibiotique à 5μg/mL pour le reste de l'infection. L'activité de IRF-3 a été détectée grâce à sa dimérisation, par gel d'acrylamide natif (b, d, f), ou grâce à sa phosphorylation, par SDS-PAGE (a, c, e). IRF-3 a été révélé par un anticorps anti-IRF-3 (2μg/mL).

### **Les bactéries EPEC n'activent pas IRF-3**

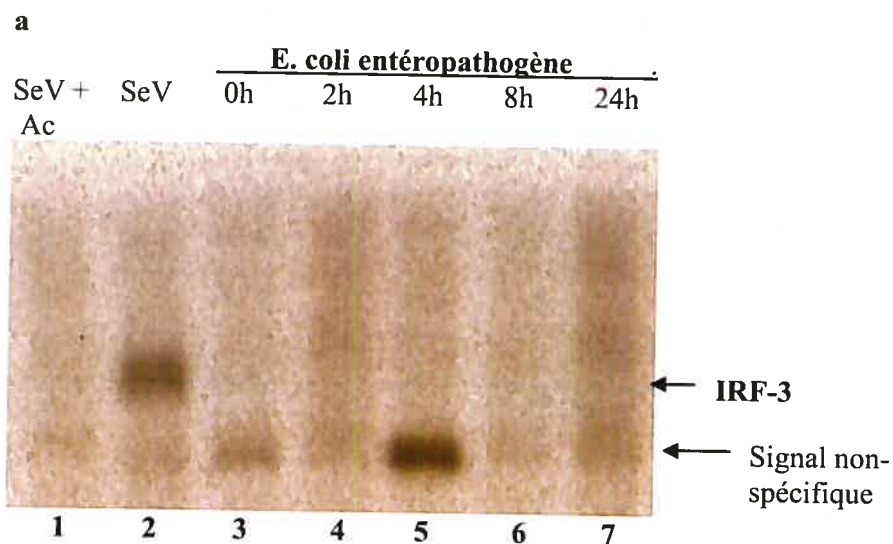
Les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC), sont de proches parents de *S.typhimurium* (231). Ainsi, nous avons voulu savoir si elles aussi pouvaient potentiellement activer IRF-3. La dimérisation et l'activation, c'est-à-dire la capacité à lier l'ADN, ont dans ce cas été mesurées par gel d'acrylamide natif et par EMSA, de la même manière que pour *S.typhimurium*. Les figures 24 et 25a montrent que IRF-3 n'est pas dimérisé et ne se lie pas de façon détectable à l'ADN chez des cellules HeLa infectées par des EPEC. La mutation de la composante TIR du système d'injection ( $\Delta$ TIR), ne rétablit pas l'activation de IRF-3. La répétition des mêmes manipulations chez des cellules U937 différenciées en macrophages par le phorbol ester PMA n'a pas donné de résultats différents (résultats non montrés).

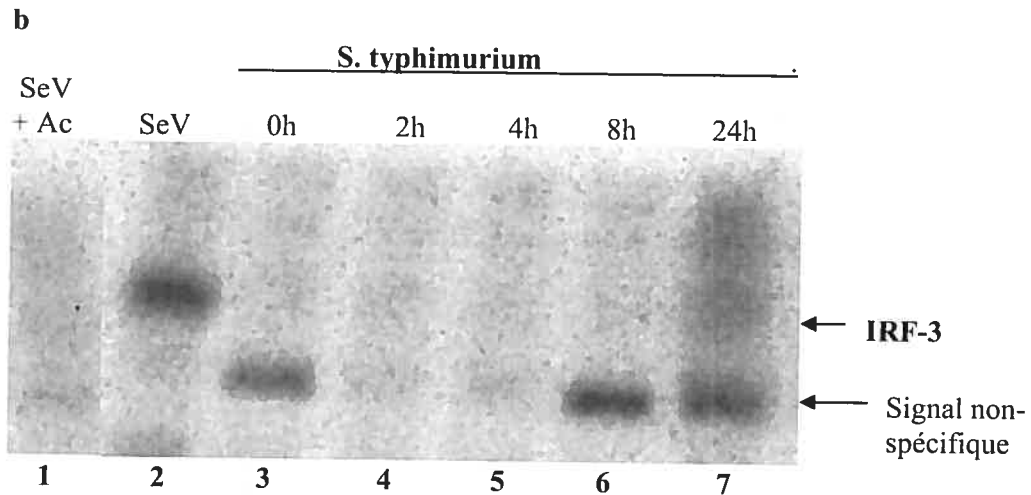
Un contrôle positif supplémentaire, où un supershift par un anticorps anti-IRF-3 sur des échantillons infectés par des bactéries est tenté, fait défaut aux figures 24 et 25 et il serait approprié de l'inclure sur d'éventuelles répétitions de ces manipulations. En effet, bien qu'il soit connu que le virus de Sendaï active IRF-3 et en provoque donc une dimérisation (154), il n'est pas exclu que les bactéries étudiées conduisent à la formation de complexes avec d'autres membres des IRF-3, produisant ainsi des bandes en EMSA ne migrant pas à la même hauteur. Par exemple, en plus de former des hétérodimères avec IRF-7, tel que décrit plus haut (222), IRF-3 peut, en réponse à la stimulation virale, se lier à IRF-5 (276).





**Figure 24: *E. coli* n'active pas IRF-3 chez des cellules HeLa.** Des cellules HeLa ont été infectées avec des bactéries EPEC de souche E2348/69 sauvage(a) ou  $\Delta$ TIR (b) pour les durées indiquées ou par le contrôle Sendai Virus (100HAU/10<sup>6</sup> cellules). De la gentamycine (100 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) a été ajoutée deux heures post-infection. L'activité de IRF-3 a été détectée grâce à sa dimérisation, par Western blot sur un gel d'acrylamide natif. IRF-3 a été révélé par un anticorps anti-IRF-3 (2 $\mu$ g/mL).





**Figure 25: *S. typhimurium* et *E. coli* n'activent pas IRF-3 chez des cellules HeLa, tel que démontré par EMSA.** Des cellules HeLa ont été infectées avec des bactéries EPEC de souche E2348/69 sauvage (a) ou *S. typhimurium* de souche sauvage (b). L'activation de IRF-3 a été détectée par EMSA avec la sonde ISG15 radiomarquée. La migration a été réalisée sur un gel d'acrylamide non dénaturant.

#### **Skp2 interagit avec IRF-3 *in vitro***

Comme il est connu que IRF-3, suite à une activation prolongée, est dégradé par un mécanisme impliquant le protéasome, puisqu'il est inhibé par le MG132 (154), et que les protéines hyperphosphorylées comme IRF-3 sont souvent menées à l'ubiquitination/dégradation via un complexe d'ubiquitine ligase de type SCF (49), nous avons voulu déterminer si une des composantes d'un tel complexe, Skp2, était capable d'interagir avec IRF-3.

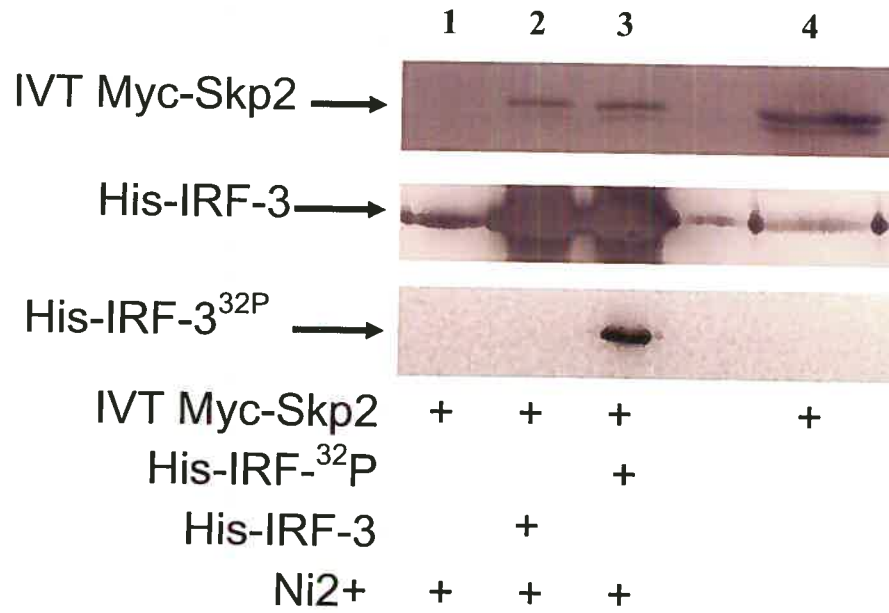
Les protéines cycline E et  $\beta$ -caténine sont des exemples subissant une dégradation selon un mécanisme nécessitant un complexe SCF (272). Il avait été préalablement mis en évidence dans notre laboratoire, par surexpression et co-immunoprécipitation, que IRF-3 était ubiquitiné (Annie Bibeau-Poirier et Marc Servant, résultats non publiés). L'implication de Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) est connue, entre autres, dans la dégradation de l'inhibiteur de CDK p27, un mécanisme de contrôle du cycle cellulaire (30), dans celle du facteur de transcription c-Myc, une oncoprotéine contrôlant l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire, l'apoptose et l'oncogénèse (254) et dans la dégradation du facteur de transcription FOXO1, modulant l'expression de gènes contrôlant l'arrêt

du cycle cellulaire et l'apoptose (121). La capacité de Skp2 à induire l'ubiquitination d'un facteur de transcription ne serait donc pas une nouveauté.

Comme, dans les complexes SCF, la F-box protein Skp2 est responsable de l'interaction avec le substrat, via des répétitions riches en leucine, (272), nous avons voulu savoir si Skp2 et IRF-3 étaient capables de s'associer *in vitro*. Nous avons donc produit, *in vitro*, par un système de transcription/traduction, la protéine chimérique Myc-Skp2 et, par un système bactérien, la protéine chimérique His-IRF-3, possédant une série d'histidines permettant son isolement par un système de billes nickel/sépharose capables de s'y lier. Nous avons ensuite incubé Myc-Skp2 et IRF-3, fait un *pull-down* sur His-IRF-3, puis migré sur gel SDS-PAGE. Dans le contrôle négatif, nous avons fait un *pull-down* His sur une réaction ne contenant que Myc-Skp2, sans His-IRF-3. Nous avons également voulu déterminer si l'état de phosphorylation de IRF-3 modifiait sa capacité à interagir avec Skp2. Pour ce faire, nous avons réalisé un essai kinase avec de l'ATP radiomarké, sur IRF-3, avec la kinase flag-IKKe produite *in vitro*, préalablement au couplage avec Myc-Skp2.

La figure 26 (ligne 1) montre que Myc-Skp2 n'est pas détectable si le *pull-down* His est fait sans His-IRF-3 : cela signifie une absence d'interaction non spécifique entre Myc-Skp2 et les billes de nickel-sépharose, utilisées pour le *pull-down*. Les lignes 2 et 3 montrent en revanche une apparition de Myc-Skp2 si la même réaction est faite en présence de His-IRF-3, phosphorylé ou non. Il ne semble pas y avoir modulation de l'interaction entre Myc-Skp2 et His-IRF-3 en fonction de l'état de phosphorylation de ce dernier. Il convient de noter que His-IRF-3 a tendance à diffuser d'un puit à l'autre, ce qui explique sa détection aux lignes 1 et 4.

Ce résultat signifie que Myc-Skp2 suit His-IRF-3 lors d'un *pull-down*, donc, qu'ils sont susceptibles d'interagir ensemble, du moins *in vitro*.



**Figure 26: Interaction *in vitro* de Myc-Skp2 et His-IRF-3.** Le produit de l'incubation de Myc-Skp2, produit *in vitro*, et de His-IRF-3 (ligne 2) ou His-IRF-3<sup>32P</sup> (ligne 3) a été déposé sur gel SDS-PAGE après un pull-down par des billes de nickel/sépharose. La ligne 1 contient Myc-Skp2 ayant subi un pull-down par des billes de nickel/sépharose sans avoir été incubé avec His-IRF-3. La ligne 4 contient le produit de la traduction *in vitro* Myc-Skp2, à titre d'indication. La présence de Myc-Skp2 a été détectée par un anticorps dirigé contre l'épitope Myc (9E10) (1µg/mL) et celle de His-IRF-3, suite au « strippage » de la membrane, par un anticorps dirigé contre le domaine NES de IRF-3 (1µg/mL).

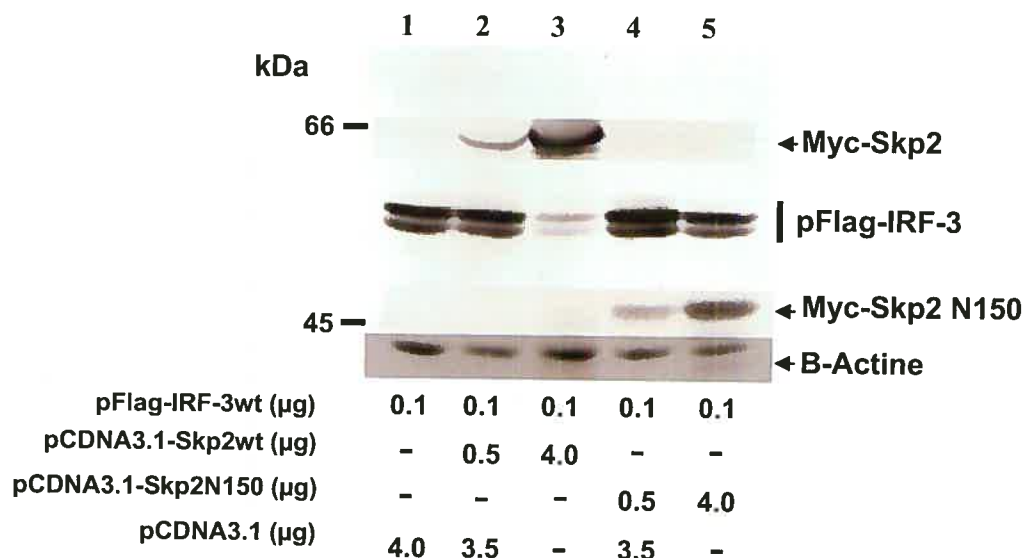
La réciproque de l'expérience illustrée à la figure 26, c'est-à-dire la détection de His-IRF-3 suite à une immunoprécipitation de Myc-Skp2 a été problématique, vu les interactions non spécifiques récurrentes entre His-IRF-3 et les billes couplées à un anticorps anti-Myc. La substitution des épitopes couplés aux protéines (flag-Skp2, Ha-Skp2, GST-IRF-3) n'a pas permis de surmonter ce problème.

### La surexpression de Skp2 induit la dégradation de IRF-3

Parce que les complexes SCF<sup>Skp2</sup> mènent à l'ubiquitination de leurs substrats, dont le résultat est la dégradation via le protéasome (272), nous avons voulu savoir si la surexpression conjointe de Skp2 et d'IRF-3 avait un effet sur la stabilité de ce dernier. Le modèle cellulaire utilisé a été la cellule HEK293T, facile à transfecter.

Les cellules ont été transfectées avec une quantité constante de flag-IRF-3 (100ng), et avec 0,5µg ou 4,0µg de Myc-Skp2 wt ou N150 dominant négatif. Cette

dernière construction possède une mutation dans son domaine F-box, empêchant l'interaction avec les autres membres du complexe SCF (figure 28). Après 36h de transfection, les cellules ont été traitées 4h au cycloheximide : en bloquant la traduction de nouvelles protéines, la dégradation de la quantité de IRF-3 présente au début du traitement peut être mieux visualisée. La figure 27 montre que, en comparaison avec le contrôle sans Skp2 (ligne 1), la présence de 4,0µg de Myc-Skp2 wt induit une forte dégradation de IRF-3 (ligne 3), alors que la présence de Myc-Skp2 N150 annule cet effet.



**Figure 27: Dégradation de flag-IRF-3 par la surexpression de Myc-Skp2.** Un vecteur codant pour IRF-3 a été transfecté dans des cellules HEK293T, dans chaque condition. Ont également été transfectés Myc-Skp2 (lignes 2 et 3) ou Myc-Skp2 N150 (lignes 4 et 5). Les lysats cellulaires ont été migrés sur SDS-PAGE et IRF-3 révélé par immunobuvardage, à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope flag (1µg/mL), alors que Myc-Skp2 et Myc-Skp2 N150 l'ont été par un anticorps dirigé contre l'épitope Myc (9E10) (1µg/mL). Un chargement égal de protéines dans chaque puit a été vérifié par un anticorps anti-actine.

La surexpression de Myc-Skp2 fonctionnel induit donc une instabilité de la protéine IRF-3, alors qu'un mutant non fonctionnel, Myc-Skp2 N150, ne le fait pas significativement. Le rapport optimal Skp2 : IRF-3 (m :m) est de 40 :1.

## DISCUSSION

Aux premières loges de la reconnaissance des envahisseurs viraux, bactériens, ou fongiques, se trouvent les *toll-like receptors* : l'expression induite par les TLR, de gènes codant pour des cytokines proinflammatoires, des interférons, et des molécules co-stimulantes, en combinaison avec la présentation d'antigènes médiée par la phagocytose, mènent au développement de l'immunité adaptative (241). L'induction génique par les TLR fait appel à des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, IRF-3 et AP-1) dont l'activation implique une série de kinases et d'adaptateurs (241). La connaissance des mécanismes modulant l'activité d'un de ces facteurs de transcription, IRF-3, est encore incomplète, et est d'une grande importance en immunologie, vu le rôle de pivot que celui-ci joue dans l'établissement d'une stratégie précoce de lutte aux pathogènes.

Les questions abordées dans ce mémoire touchaient les voies de signalisation menant à l'activation d'IRF-3 (phosphorylation de TRIF), la capacité de pathogènes bactériens à l'activer ou non (*S.typhimurium* et *E.coli*), ainsi que les mécanismes responsables de sa dégradation via le protéasome (complexe SCF<sup>Skp2</sup>).

À l'aune des résultats obtenus, nous pouvons tout d'abord affirmer que la phosphorylation des sérines 270,359 et 673 n'a aucun effet sur la capacité de TRIF à moduler l'activation des facteurs de transcription IRF-3 et NF- $\kappa$ B (Figures 21 et 22). Comme le site S673 se trouve dans le domaine RHIM de TRIF, dont la capacité de liaison avec RIP-1, menant à l'activation de NF- $\kappa$ B a été démontrée (174), la phosphorylation de ce résidu aurait pu avoir un impact sur l'activation de ce facteur de transcription. La phosphorylation de TRIF avait été mise en évidence par la migration plus lente d'un TRIF co-immunoprécipité avec la kinase TBK1, par rapport à la même expérience en présence de TBK1 dominant négatif (Figure 12, 215). Ces résidus particuliers avaient été choisis pour leur fort potentiel de phosphorylation par la kinases p38, établis à l'aide de l'algorithme disponible sur le site Scansite (Figure 19).

Une approche logique dans la poursuite de ce projet consisterait en la création de fragments de TRIF de différentes longueurs, couvrant la protéine en entier, et clonés dans des vecteurs d'expression. Des essais kinase, avec la kinase TBK1 (et aussi IKK- $\epsilon$ ), permettraient de déterminer dans quelle région TRIF est phosphorylé,

avant de re-soumettre la séquence à Scansite. Une telle méthode aurait l'avantage de démontrer une phosphorylation plus directe de TRIF, et de permettre de se concentrer sur des régions de la protéine, plutôt que sur son intégralité. Ceci fait, un radiomarquage *in vivo* permettrait une observation de la phosphorylation de TRIF dans des conditions un peu plus physiologiques. Cette technique consiste à priver des cellules transfectées avec TRIF de phosphate, avant de les stimuler avec un ligand activant TRIF, par exemple le poly(I :C), et de leur fournir, pour un temps limité, un milieu riche en phosphate radiomarqué. Le phosphate radiomarqué serait ainsi incorporé à TRIF, advenant une phosphorylation, et son devenir pourrait être étudié.

L'importance de déterminer les modifications post-traductionnelles responsables de l'activation de TRIF vient de sa position à la croisée des chemins, entre les voies NF- $\kappa$ B et IRF-3 (figures 10 et 11). Les sites de liaison de TBK1 et TRAF6 sur TRIF pourraient se chevaucher (215) (figure 10) et il serait possible que la phosphorylation de certains sites soit responsable de l'activation d'une voie au détriment de l'autre. Ainsi, il serait intéressant de rechercher des sites phosphoaccepteurs près du *TRAF6-binding motif* de TRIF, où se lie TRAF6 et autour duquel interagit TBK1, en plus d'examiner le domaine RHIM, qui permet la liaison de RIP-1. Cependant, une phosphorylation au niveau du domaine TIR, qui modulerait l'interaction entre TRIF et TLR3 ou TRAM ne serait pas à exclure. En réponse à l'infection par des bactéries à Gram négatif, arborant du LPS immunogène, il y a nécessité de la liaison de TBK-1 à TRIF, afin de permettre l'activation du facteur de transcription IRF-3. Cet adaptateur est donc essentiel au développement d'une réponse à ces bactéries passant par IRF-3.

Les bactéries et les cellules eucaryotes ayant co-évolué durant des millions d'années, les premières ont développé des systèmes permettant de court-circuiter les mécanismes de défense mis en place par les seconds. Les exemples abondent : la capacité de *S.typhimurium* à activer la sérine/thréonine kinase Akt, régulatrice de la survie cellulaire, dans le but d'empêcher l'apoptose de la cellule hôte (232) a déjà été mentionnée. De plus, il est connu que *Bacillus anthracis*, via sa toxine mortelle de l'anthrax (LT), est capable d'empêcher l'activation de IRF-3 (42). La LT est composée de deux sous-unités, *protective Ag* (PA) et *lethal factor* (LF), dont la seconde est une métalloprotéase à zinc qui clive de petits fragments de plusieurs isoformes de MKK, annihilant leur activité et, par le fait même, l'activation de la

kinase p38. Comme cette dernière a un rôle à jouer dans l'activation d'IRF-3 (181), cette toxine est donc un moyen pour la bactérie d'empêcher l'induction de cytokines et d'interférons. La bactérie buccale *Porphyromonas gingivalis* est capable, quant à elle, de produire différents types de LPS, dont la signification biologique est encore mal connue, mais a été suggérée pour son rôle dans la capacité de la bactérie à être un colonisateur persistant de la cavité buccale et une génératrice de maladies inflammatoires (43). Les streptocoques de groupe A (GAS) produisent quant à eux une DNase extracellulaire, SdaD2, qui permet aux bactéries d'échapper au système immunitaire (234). Des mutants au niveau de la DNase sont éliminés de l'organisme infecté beaucoup plus rapidement que les bactéries de type sauvage. L'effet de ces DNases serait de bloquer la destruction des bactéries de façon extracellulaire et non leur phagocytose.

Outre les procaryotes, des virus sont aussi capables de mettre un frein à la réponse immunitaire, en ciblant l'activation d'IRF-3, agent majeur de l'hôte pour les éradiquer : le virus de l'herpès simplex (HSV-1) exprime pour cela les protéines ICP0 et vhs (*virion host shut-off protein*) (158). ICP0 est capable de bloquer l'activation de IRF-3 et de IRF-7, par un mécanisme impliquant un RING *finger* et le protéasome, mais sans dégradation de protéine connue, alors que vhs ciblerait l'ARNm d'une manière non-spécifique, plus tard dans l'infection (158). Aussi, le virus de l'hépatite C (HCV) produit la protéase NS3/4A, dont on a déjà mentionné le rôle dans la neutralisation de RIG-1 afin de limiter la production d'interférons (67), qui est également capable de cliver l'adaptateur TRIF (152). Ce virus est donc capable de bloquer deux voies distinctes menant à la production d'interférons. Comme TRIF est situé directement après le récepteur TLR3, sa protéolyse bloque de plus à la fois l'activation de IRF-3 et celle de NF- $\kappa$ B et des cytokines proinflammatoires. Également, le coronavirus responsable du SRAS (syndrome respiratoire aigu sévère), le SARS-CoV, est capable de bloquer l'activité de promoteurs de l'IFN- $\beta$  et la production d'ARNm, en inhibant l'activation de IRF-3 (229). Cependant, le mécanisme est curieux : bien que IRF-3 ne soit plus hyperphosphorylé, n'homodimérise plus, ni ne recrute CBP, il est détectable dans le noyau après l'infection. Le virus bloquerait donc une étape rapidement après la translocation au noyau du facteur de transcription. Enfin, le cytomégalo virus humain (HCMV) produit une protéine structurale nommée pp65 (ppUL83) capable de



prévenir l'accumulation de IRF-3 au noyau et ainsi sa capacité à induire la transcription génique (1). Ces exemples ne sont pas exclusifs et d'autres virus sont également capables de moduler l'activité de IRF-3.

Nos résultats plaident pour une capacité des deux espèces pathogènes de bactéries, *S.typhimurium* et EPEC, à déjouer le système immunitaire, en empêchant l'activation du facteur de transcription IRF-3 (Figures 23 à 25). L'absence d'activation de IRF-3 ne peut être expliquée par une infection déficiente : nous avons *de visu* observé la croissance et l'internalisation des bactéries dans les cellules hôtes (résultats non montrés). L'internalisation et l'adhérence de *S.typhimurium* à la cellule HeLa n'est pas requise à l'inhibition de IRF-3 : les mutants  $\Delta$ ssaR SL1344, incapables de former des *Salmonella-containing vesicles* essentielles à l'invasion et à leur multiplication intracellulaire, ainsi que les mutants SB103 x4370, incapables d'adhérer intimement à la membrane eucaryote, étape préalable à l'invasion, n'induisaient pas d'activation d'IRF-3 (Figure 23 c à f). De même, la souche EPEC  $\Delta$ TIR, dont la composante TIR du système d'injection de type III est absente, est aussi capable que la souche sauvage d'inactiver IRF-3 (Figure 24), signifiant que l'injection de facteurs de virulence dans la cellule hôte n'est pas requise.

Comme l'internalisation ou l'injection de protéines dans les cellules HeLa n'est pas nécessaire pour permettre à ces bactéries d'échapper à l'activation d'IRF-3, ce serait plutôt soit par la modification ou l'inhibition des récepteurs transmembranaires de HeLa, comme les TLR, soit par la modification de leurs propres structures bactériennes reconnues par les cellules hôtes, comme le LPS, que *S.typhimurium* et EPEC seraient le plus probablement capables de le faire. Récemment, un article est paru, faisant référence à la capacité de *S.typhimurium* à modifier le lipide A, une composante de son LPS, afin de moduler la signalisation par TLR4 (142). Le lipide A est un disaccharide,  $\beta$ ,1'-6-lié de glucosamine phosphorylé en positions 1 et 4' et acylé en positions 2, 3, 2' et 3' par un R-3-hydroxymyristate, relativement conservé parmi les espèces bactériennes (142). L'état d'acylation du lipide A du LPS serait capable de modifier la réponse induite par TLR4 : un mélange de LPS modifiés induit une plus faible production de cytokines par des cellules endothéliales de cordon ombilical humain (88). La bactérie *S.typhimurium* possède donc un produit d'un gène de virulence, PhoP/PhoQ (88) capable de détecter le microenvironnement de l'hôte et de réguler en réponse

l'expression d'une lipide A 3-O-déacylase, PagL, et d'une lipide A palmitoyltransférase, PagP. Les produits de ces enzymes, des lipides A bactériens 3-O-déacylés et palmitoylés sont de 30 à 100 fois moins aptes que les lipides A typiques à induire une signalisation médiée par TLR4 (142). *S.typhimurium* est l'unique bactérie connue à posséder un gène codant pour PagL (142), cependant, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, qui exprime de façon constitutive une 3-O-déacylase active de façon moins forte que E.coli la signalisation par TLR4 (92).

La forme générale du LPS étant importante à sa reconnaissance par TLR4 (183), il est possible que l'état d'acylation du lipide A module la réponse immunitaire en modifiant celle-ci. En effet, en utilisant des lipides A synthétiques, possédant des secondes chaînes acyl de longueur variées, il a été montré que des composés dont celle-ci possède moins de 8 atomes de carbone de longueur ont une capacité dramatiquement réduite à activer TLR4, et été postulé que l'hexa-acylation permettait une conformation conique au LPS lui conférant une plus facile reconnaissance par TLR4 (233). La capacité de TLR4 à reconnaître le LPS ne serait pas uniquement fonction du nombre d'acides gras sur le lipide A, mais aussi de leur localisation sur le squelette de glucosamine et de leur longueur (142).

La capacité de *Salmonella* à déjouer le système immunitaire a récemment été portée à un niveau supérieur, lorsque a été découverte une coordination de la modification des molécules de surface de la bactérie, opérée par PhoP/PhoQ, en vue de limiter à la fois l'immunité innée et l'immunité adaptative (18). Suite à l'infection de souris par *Salmonella*, et à la reconnaissance par le système immunitaire inné (DC, neutrophiles, macrophages), des lymphocytes CD4<sup>+</sup> sont produits, qui ciblent spécifiquement des protéines associées à la bactérie : ceux-ci reconnaissent des protéines de différentes masses moléculaires, issues de la fragmentation par SDS-PAGE de lysats bactériens (18). Des organelles bactériens de surface, le flagelle et les vésicules membranaires (MV), contenant plusieurs facteurs de virulence bactériens, stimulent les TLR et contiennent également les antigènes reconnus par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> (18). Les produits des gènes de virulence PhoP/PhoQ sont capables d'induire une diminution de l'expression de ces molécules de surface : il y a donc modulation de la reconnaissance primaire par les TLR, mais aussi de la reconnaissance ultérieure par les lymphocytes CD4<sup>+</sup> du système immunitaire adaptatif.

La modulation par les bactéries de la reconnaissance par les TLR de leurs composantes peut être négative, mais également positive : la bactérie intracellulaire *Shigella flexneri*, proche de *E.coli*, libère dans le milieu de culture, lors de sa phase de croissance exponentielle, des lipoprotéines bactériennes qui activent TLR2 (7). Le rôle de ce mécanisme serait d'induire l'apoptose des macrophages attirés au site d'infection, à l'aide d'un facteur de virulence, IpaB, ainsi que celle d'autres cellules des follicules lymphoïdes intestinaux, sites de l'infection, dans le but de favoriser la croissance bactérienne (7). La réponse immunitaire induite par les TLR, en recrutant au site d'infection des cellules permissives pour la réplication bactérienne, serait aussi de cette façon mise à profit (18). C'est probablement en réponse à cela que c'est développé chez l'hôte le mécanisme de blocage par le LPS de la différenciation de monocytes inflammatoires en DC, au site de la reconnaissance du PAMP, empêchant l'évasion de cellules infectées (209).

Il semblerait donc que pour *S.typhimurium*, l'aptitude à éluder la réponse immunitaire induite par l'activation de IRF-3 soit liée à la modification du LPS et à une diminution de l'expression de molécules immunogènes de surface, contrôlées par les facteurs de virulence PhoP/PhoQ (142, 18). La bactérie *E.coli* étant évolutivement proche de *S.typhimurium*, leur divergence ne datant que de 100 millions d'années environ (149), il serait plausible qu'ils utilisent un système similaire. De plus, les bactéries sont reconnues pour leur capacité à transférer des gènes leur assurant un avantage sur leur capacité à se reproduire : un simple fragment d'ADN peut permettre à une souche *E.coli* inoffensive d'acquérir un phénotype de pathogénicité (149). Il ne serait donc pas étonnant que si un système efficace permettant l'infection de cellules eucaryotes se soit développé, il ait été partagé entre différentes bactéries.

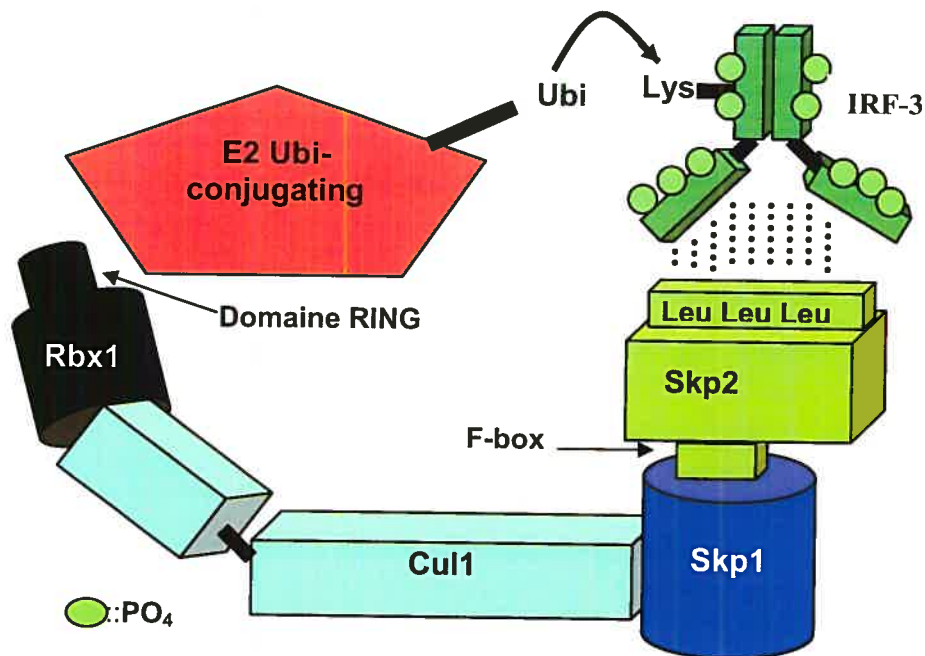
La continuation logique de ce projet impliquerait la création de mutants PhoP/PhoQ chez *S.typhimurium* et la vérification de l'effet sur l'activation d'IRF-3. Pour les EPEC, il faudrait identifier les protéines possiblement impliquées dans la modification des molécules de surface. Vu leur parenté évolutive, une recherche d'homologie de séquence avec PhoP/PhoQ de *S.typhimurium*, sur le génome des EPEC procurerait probablement des candidats intéressants.

Le facteur de transcription IRF-3 n'est cependant pas inhibé dans la majeure partie des infections efficaces. Son action, modulatrice de l'expression des interférons doit être sévèrement contrôlée après son déclenchement. La dégradation de IRF-3 suite à une stimulation cellulaire prolongée, par un mécanisme impliquant le protéasome, était connue, sans que ne le soient les détails (154). La dégradation de protéines par le protéasome 26S est un mécanisme, contrairement à celle se déroulant dans les lysosomes, dépendant de l'ATP. Elle a été mise en évidence lorsque fut découvert un système de protéolyse soluble, consommateur d'ATP, dans des réticulocytes (précurseurs d'érythrocytes dépourvus de lysosomes) de lapin (62). Dans le cytosol des réticulocytes, Ciechanover et ses collègues trouvèrent une protéine, APF-1, se liant de façon covalente à certaines protéines en présence d'ATP (38). L'équipe de Wilkinson finit par montrer que cette APF-1 était en fait l'ubiquitine (258), découverte dès 1975 (83) et connue pour se lier de façon covalente à d'autres protéines (82). L'ubiquitination est aujourd'hui considérée comme un marquage destinant les protéines à la dégradation par le protéasome.

Une série de complexes protéiques sont nécessaire à la sélection du substrat et au transfert sur celui-ci d'une chaîne d'ubiquitine : les *Ubiquitin activating enzymes* (E1), les *Ubiquitin conjugating enzymes* (E2), et les *Ubiquitin protein ligase* (E3). L'ubiquitine doit dans une première étape être activée par une E1, qui après hydrolyse de l'ATP, forme avec elle un complexe ubiquitine-adénylate puis un lien thioester (89, 199). L'ubiquitine est ensuite conjuguée, lorsqu'elle est transférée vers une E2, avec laquelle elle forme un lien thiol-ester. La spécificité du substrat est conférée par la E3 (143, 254), dont la plupart des organismes possèdent plusieurs types, contre quelques E2 et une seule E1 (199). La E3 transfère finalement, par un lien isopeptide covalent (272), l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat pour former une chaîne de poly-ubiquitine (143).

Sachant que IRF-3 était polyubiquitiné (Annie-Bibeau Poirier, Marc Servant, résultats non publiés), c'est sur l'identification de la E3 ligase impliquée dans sa dégradation que nos efforts se sont concentrés. Il s'agit d'un complexe multi-protéique comprenant deux grandes familles : les HECT-type, formant un intermédiaire E3-ubi-thioester, et les RING-type, ne semblant pas former un tel intermédiaire (272). Les E3 RING-type de type SCF, d'après leurs composantes, Skp1-Cullin- F-box protein (en plus de Rbx1), forment la grande majorité. De plus,

les protéines hyperphosphorylées, telles IRF-3, sont fréquemment ciblées par des complexes SCF (19, 28). Le pont avec la E2 est fait via le domaine RING de Rbx1 (70a.a.). Un long bras de 110Å sert de protéine d'échafaudage, maintenant à la bonne distance la E2 de la protéine substrat : la culline (Cul1) (Figure 28). Entre Cul1 et la F-box protein, partie variable du complexe, responsable de la sélection du substrat (272) se trouve Skp1, membre de la famille des cullines. Le motif F-box, d'environ 40-50 acides aminés, présent chez 38 protéines humaines, présent en général en N-terminal, est peu conservé et difficilement discernable à l'œil (143).



**Figure 28: Complexe SCF-ubiquitine ligase proposé pour l'ubiquitination de IRF-3.** IRF-3 interagit avec Skp2 via ses répétitions riches en leucine. L'ubiquitine est transférée sur un résidu lysine de IRF-3 par la E2 Ubiquitin-conjugating, qui est recrutée au complexe E3 via le domaine RING de Rbx1.

Une protéine à F-box d'un intérêt particulier est Skp2 : elle est impliquée, comme déjà mentionné, dans la dégradation de l'inhibiteur de CDK  $p27^{Kip1}$  (30), dans celle des facteurs de transcription c-Myc (254) et FOXO1 (121), en plus de mener à la protéolyse de  $p57^{Kip2}$  (135). Son rôle dans la régulation du cycle cellulaire fait que son expression et sa stabilité varie en fonction des phases de celui-ci. Par exemple, chez les cellules musculaires lisses vasculaires, la prolifération est régulée par le contrôle de la stabilité de Skp2 par la focal-adhesion kinase (FAK) (21). Skp2

est liée à Skp1 via sa F-box et interagit avec le substrat à l'aide de répétitions riches en leucine (217).

Nous avons démontré une interaction entre Skp2 et IRF-3, à l'aide de protéines produites *in vitro* (Figure 26). Les protéines n'étant pas issues d'un lysat cellulaire, l'absence de composantes cellulaires, outre celles potentiellement originaires des réticulocytes de lapin utilisés pour la production *in vitro* des protéines, plaide pour une interaction directe, sans l'intermédiaire de protéines adaptatrices. La phosphorylation d'IRF-3 par la kinase IKK- $\epsilon$  ne semble pas moduler l'interaction avec Skp2. L'explication probable est qu'aux concentrations non-physiologiques de protéines utilisées lors de l'incubation, les interactions protéines-protéines sont si favorisées que la phosphorylation, probablement importante en conditions normales, n'a plus un effet significatif.

En plus d'interagir avec IRF-3, nos résultats, réalisés dans un système cellulaire où les autres composantes du système ubiquitination/protéolyse sont présentes de façon endogène, démontrent que la co-transfection de Skp2 contribue à diminuer sa stabilité (figure 27). Après un temps assez long laissé après la transfection, afin d'assurer une expression suffisante des protéines, les cellules ont été traitées 4h au cycloheximide, afin que la dégradation de IRF-3 ne soit pas compensée par une néosynthèse. La même expérience, effectuée avec un Skp2 N150, possédant une mutation dans sa F-box, donc déficient dans sa liaison au reste du complexe SCF, ne montre pas une dégradation de IRF-3 comparable au Skp2 sauvage (figure 27 lignes 1, 4, 5).

Pris ensemble, ces résultats montrent que Skp2 est capable d'interagir avec IRF-3 et de mener à sa dégradation, conditionnellement à sa capacité de lier le reste du complexe SCF via sa F-box. Ce mécanisme permet, une fois la transcription des gènes sous contrôle de IRF-3 activée, de limiter dans le temps l'activité transcriptionnelle de gènes dont le produit peut à long terme être dommageable à la cellule, par exemple, en induisant l'apoptose (108, 202). La régulation négative de facteurs de transcription est un phénomène courant et essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. Par exemple, NF- $\kappa$ B possède un mécanisme de rétro-inhibition en stimulant, suite à son activation, la production de son propre inhibiteur, I $\kappa$ B $\alpha$ , responsable de la translocation du facteur de transcription vers le cytosol (101).

## CONCLUSION

La connaissance de la régulation de l'expression génique nous approche de l'essence même de la vie, qui fait entrer en jeu des concepts tels l'homéostasie, l'auto conservation et l'auto réplication de l'organisme, qui sont, à la base, codés dans l'ADN. Les moyens que prend un organisme pour coordonner l'expression de la phénoménale quantité d'information disponible dans un génome peuvent, lorsque déficients, être à l'origine d'abérations menant à la destruction de la vie, comme le cancer. Sur un plan plus pratique, l'acquisition d'informations sur les facteurs de transcription, sur les voies signalétiques menant à leur activation, ainsi que sur les facteurs environnementaux interagissant avec eux (bactéries, virus, cytokines, facteurs de croissance, etc.) permet à l'homme de repousser de plus en plus efficacement la maladie, en combattant cancer et infections, et d'ainsi octroyer à sa fonction d'auto-conservation une dimension supérieure.

L'immunologie est une science relativement jeune, et sa branche cadette, l'étude du système immunitaire inné, est en voie d'ouvrir de nouvelles avenues permettant de battre en brèche des maladies jusqu'alors incurables. Le facteur de transcription IRF-3 possède un rôle central dans la mise sur place d'une stratégie précoce de lutte contre l'infection. Il est ainsi une cible privilégiée d'organismes désireux de pénétrer la cellule hôte en éludant son système immunitaire. Nous avons montré que les bactéries *S.typhimurium* et *E.coli* entéropathogènes sont de tels organismes capables de bloquer l'activation d'IRF-3. L'élucidation précise des mécanismes leur conférant cette aptitude permettra à terme de leur opposer une lutte plus efficace et de sauver des vies dans les pays où les infections causées par ces procaryotes sont endémiques. Nous avons aussi tenté de clarifier les modifications post-traductionnelles subies par l'adaptateur TRIF lors de son activation. Bien que n'ayant pas réussi à cibler les sites précis de la phosphorylation, nos résultats ne la remettent pas en question et leur identification n'est qu'une question de temps et de volonté. Nous avons finalement jeté un peu de lumière sur les mécanismes responsables de la dégradation de IRF-3, après que son rôle eût été joué, et identifié la protéine Skp2 pour son rôle dans ce phénomène.

## REFERENCES

1. Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol.*, **78(20)**:10995-1006.
2. Agalioti T, Lomvardas S, Parekh B, Yie J, Maniatis T, Thanos D. (2000). Ordered recruitment of chromatin modifying and general transcription factors to the IFN-beta promoter. *Cell*, **103**: 667-678.
3. Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. (2003). Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. *J Exp Med*, **198(7)**:1035-42.
4. Akira S, Takeda K, Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.*, **2(8)**:675-80.
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 3<sup>rd</sup> Edition. Garland Publishing, New York.
6. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. (2001). Recognition of doublestranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-38.
7. Aliprantis AO, Weiss DS, Radolf JD, Zychlinsky A. (2001). Release of Toll-like receptor-2-activating bacterial lipoproteins in *Shigella flexneri* culture supernatants. *Infect Immun.* **69(10)**:6248-55.
8. Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell.*, **42(3)**:779-89.
9. Anonyme (2004). Editorial: Toll Bridges. *Nature Immunology*, **5(10)**: 969.
10. Applequist SE, Wallin RP, Ljunggren HG. (2002). Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines. *Int Immunol.*, **14(9)**:1065-74.
11. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R 3rd, Kumamoto T, Edelbaum D, Morita A, Bergstresser PR, Takashima A. (2000). Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.*, **275(26)**:20157-67.
12. Au, W. (1995). Identification of a Member of the Interferon Regulatory Factor Family that Binds to the Interferon-Stimulated Response Element and



Activates Expression of Interferon-Induced Genes. *PNAS*, **92(25)**: 11657–11661.

13. Baetz A, Frey M, Heeg K, Dalpke AH. (2004). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins indirectly regulate toll-like receptor signaling in innate immune cells. *J Biol Chem.*, **279(52)**:54708-15.
14. Barber GN, Wambach M, Thompson S, Jagus R, Katze MG. (1995). Mutants of the RNA-dependent protein kinase (PKR) lacking double-stranded RNA binding domain I can act as transdominant inhibitors and induce malignant transformation. *Mol Cell Biol.*, **15(6)**:3138-46.
15. Barnes B, Lubyova B, Pitha PM. (2002). On the role of IRF in host defense. *J Interferon Cytokine Res.*, **22(1)**:59-71.
16. Barton G.M. et Medzhitov R. (2003). Linking Toll-like receptors to IFN- $\alpha/\beta$  expression. *Nature Immunology*, **4(5)**: 432-433.
17. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98(16)**:9237-42.
18. Bergman MA, Cummings LA, Barrett SL, Smith KD, Lara JC, Aderem A, Cookson BT. (2005). CD4<sup>+</sup> T cells and toll-like receptors recognize *Salmonella* antigens expressed in bacterial surface organelles. *Infect Immun.*, **73(3)**:1350-6.
19. Bhattacharya S, Garriga J, Calbo J, Yong T, Haines DS, Grana X. (2003). SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells. *Oncogene.*, **22(16)**:2443-51.
20. Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol.*, **76(17)**:8729-36.
21. Bond M, Sala-Newby GB, Newby AC. (2004). Focal adhesion kinase (FAK)-dependent regulation of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp-2) stability. A novel mechanism regulating smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.*, **279(36)**:37304-10.
22. Bonnard M, Mirtsos C, Suzuki S, Graham K, Huang J, Ng M, Itie A, Wakeham A, Shahinian A, Henzel WJ, Elia AJ, Shillinglaw W, Mak TW, Cao Z, Yeh WC. (2000). Deficiency of T2K leads to apoptotic liver degeneration and impaired NF-kappaB-dependent gene transcription. *EMBO J.*, **19(18)**:4976-85.

23. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE. (1997). The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett.*, **402(1)**:81-4.
24. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. (2002). Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med.*, **196(3)**:407-12.
25. Brumell JH et al. (2001). SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol.* **3(2)**:75-84.
26. Burns K, Clatworthy J, Martin L, Martinon F, Plumpton C, Maschera B, Lewis A, Ray K, Tschopp J, Volpe F. (2000). Tollip, a new component of the IL-1RI pathway, links IRAK to the IL-1 receptor. *Nat Cell Biol.*, **2(6)**:346-51.
27. Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J. (2003). Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med.*, **197(2)**:263-8.
28. Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene.*, **23(11)**:2050-6.
29. Buss H, Dorrie A, Schmitz ML, Hoffmann E, Resch K, Kracht M. (2004). Constitutive and interleukin-1-inducible phosphorylation of p65 NF- $\kappa$ B at serine 536 is mediated by multiple protein kinases including I $\kappa$ B kinase (IKK)- $\alpha$ , IKK  $\beta$ , IKK  $\epsilon$ , TRAF family member-associated (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), and an unknown kinase and couples p65 to TATA-binding protein-associated factor II31-mediated interleukin-8 transcription. *J Biol Chem.*, **279(53)**:55633-43.
30. Carrano, A.C. (1999). Skp2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol.*, **1(4)**: 193-199.
31. Carroll, SS. et al. (1996). Cleavage of Oligoribonucleotides by the 2',5'-Oligoadenylate- dependent Ribonuclease L. *J. Biol. Chem.*, **271(9)**: 4988-4992.
32. Carroll SS, Cole JL, Viscount T, Geib J, Gehman J, Kuo LC. (1997). Activation of RNase L by 2',5'-oligoadenylates. Kinetic characterization. *J Biol Chem.*, **272(31)**:19193-8.
33. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. (2003). Nods, Naips and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol.*, **5(9)**:581-92.
34. Chariot A, Leonardi A, Muller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U. (2002). Association of the adaptor TANK with the I  $\kappa$ B kinase (IKK) regulator

- NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *J Biol Chem.*, **277(40)**:37029-36.
35. Chebath J, Benech P, Revel M, Vigneron M. (1987). Constitutive expression of (2'-5') oligo A synthetase confers resistance to picornavirus infection. *Nature.*, **330(6148)**:587-8.
  36. Cherayil BJ. (2003). How not to get bugged by bugs: mechanisms of cellular tolerance to microorganisms. *Curr Opin Gastroenterol.*, **19(6)**:572-7.
  37. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.*, **278(5344)**:1803-5.
  38. Ciechanover, A., Heller, H., Elias, S., Haas, A.L. & Hershko, A. (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** 1365-1368.
  39. Cole JL, Carroll SS, Kuo LC. (1996). Stoichiometry of 2',5'-oligoadenylate-induced dimerization of ribonuclease L. A sedimentation equilibrium study. *J Biol Chem.*, **271(8)**:3979-81.
  40. Cooper AM, Pearl JE, Brooks JV, Ehlers S, Orme IM. (2000). Expression of the nitric oxide synthase 2 gene is not essential for early control of Mycobacterium tuberculosis in the murine lung. *Infect Immun.*, **68(12)**:6879-82.
  41. Cotran RS, Collins T, Robbins SL, Kumar V., *Pathologic Basis of Disease*, 6<sup>th</sup> Edition, Elsevier Science, 1998, p.341-357.
  42. Dang O, Navarro L, Anderson K, David M. (2004). Cutting edge: anthrax lethal toxin inhibits activation of IFN-regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *J Immunol.*, **172(2)**:747-51.
  43. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. (2004). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun.*, **72(9)**:5041-51.
  44. Dean P, Kenny B. (2004). Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol Microbiol.*, **54(3)**:665-75.

45. Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P. (2002). IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J Clin Invest.*, **109(10)**:1271-7.
46. De Haro C, Mendez R, Santoyo J. (1996). The eIF-2 $\alpha$  kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.*, **10(12)**:1378-87.
47. Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell.*, **103(2)**:351-61.
48. Der, SD. et al. (1998). Identification of genes differentially regulated by interferon  $\alpha$ ,  $\beta$ , or  $\gamma$  using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95(26)**: 15623–15628.
49. Derouet M, Thomas L, Cross A, Moots RJ, Edwards SW. (2004). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J Biol Chem.*, **279(26)**:26915-21.
50. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.*, **303(5663)**:1529-31.
51. Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Rollinghoff M, Gresser I, Bogdan C. (1998). Type 1 interferon (IFN $\alpha$ /beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity.*, **8(1)**:77-87.
52. Dong, B. & Silverman, BH. (1995). 2-5A-dependent RNase Molecules Dimerize during Activation by 2-5A. *J Biol Chem.*, **270(8)**:4133-7.
53. Dong B, Silverman RH. (1997). A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *J Biol Chem.*, **272(35)**:22236-42.

54. Etlinger, J. & Goldberg, A.L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 54-58.
55. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA. (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature.*, **413(6851)**:78-83.
56. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. (2003). LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med.*, **198(7)**:1043-55.
57. Fitzgerald, K.A. *et al.* (2003). IKK $\epsilon$  and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*. **4(5)**: 491-496.
58. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, Akira S, Aderem A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.*, **432(7019)**:917-21.
59. Foy E, Li K, Sumpter R Jr, Loo YM, Johnson CL, Wang C, Fish PM, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. (2005). Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102(8)**:2986-91.
60. Francone OL. (2003). SR-BI: a new player in an old game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **23(9)**:1486-7.
61. Fujii Y., et al.(1999). Crystal structure of an IRF-DNA complex reveals novel DNA recognition and cooperative binding to a tandem repeat of core sequences. *The EMBO Journal*, **18** : 5028-5041
62. Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Akazawa T, Yamamoto A, Seya T. (2004). The cytoplasmic 'linker region' in Toll-like receptor 3 controls receptor localization and signaling. *Int Immunol.*, **16(8)**:1143-54.
63. Galan J.E. et Curtis III, R. (1989). Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86(16)**:6383-7.
64. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.*, **197(9)**:1107-17.
65. Gauthier et al. (2000). Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *E.coli* Tir insertion into host membranes. *Infection and Immunity*, **68(7)**: 4344-4348.

66. Gauthier et al. (2003). Bacterial Injection Machines. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(28): 25273-25276.
67. Georgel P, Naitza S, Kappler C, Ferrandon D, Zachary D, Swimmer C, Kopczynski C, Duyk G, Reichhart JM, Hoffmann JA. (2001). Drosophila immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. *Dev Cell*, **1**(4):503-14.
68. Gerttula S, Jin YS, Anderson KV. (1988). Zygotic expression and activity of the Drosophila Toll gene, a gene required maternally for embryonic dorsal-ventral pattern formation. *Genetics*, **119**(1):123-33.
69. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*, **167**(4):1882-5.
70. Ghosh SK, Kusari J, Bandyopadhyay SK, Samanta H, Kumar R, Sen GC. (1991). Cloning, sequencing, and expression of two murine 2'-5'-oligoadenylate synthetases. Structure-function relationships. *J Biol Chem*, **266**(23):15293-9.
71. Ghosh A, Sarkar SN, Rowe TM, Sen GC. (2001). A specific isozyme of 2'-5' oligoadenylate synthetase is a dual function proapoptotic protein of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*, **276**(27):25447-55.
72. Ghosh S et Karin M. (2002). Missing Pieces in the NF- $\kappa$ B Puzzle. *Cell*, **9**:S81-S96.
73. Gohda J, Matsumura T, Inoue J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J Immunol*, **173**(5):2913-7.
74. Goldknopf, I.L. & Busch, H. (1977). Isopeptide linkage between non-histone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** 864-868.
75. Goldstein, G., Scheid, M., Hamerling, U., Boyse, E.A., Schlesinger, D.H. & Niall, D. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** 1-15.
76. Gordon S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, **111**(7):927-30.
77. Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R, Hiscott J. (2002). Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol*, **76**(11):5532-9.

78. Greaves DR, Gordon S. (2005). Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.*, **46(1)**:11-20.
79. Gregory CD, Devitt A. (2004). The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology*, **113(1)**:1-14.
80. Guo L, Lim KB, Gunn JS, Bainbridge B, Darveau RP, Hackett M, Miller SI. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science*, **276(5310)**:250-3.
81. Haas, A.L., Warms, J.V., Hershko, A. & Rose, I.A. (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* **257** 2543-2548.
82. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. (1994). Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med.*, **179(1)**:269-77.
83. Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol.*, **166(1)**:15-9.
84. Hajjar AM, Ernst RK, Tsai JH, Wilson CB, Miller SI. (2002). Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nat Immunol.*, **3(4)**:354-9.
85. Haller O, Kochs G. (2002). Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, **3(10)**:710-7.
86. Han KJ, Su X, Xu LG, Bin LH, Zhang J, Shu HB. (2004). Mechanisms of the TRIF-induced interferon-stimulated response element and NF-kappaB activation and apoptosis pathways. *J Biol Chem.*, **279(15)**:15652-61.
87. Hardy MP, McGettrick AF, O'Neill LA. (2004). Transcriptional regulation of the human TRIF (TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta) gene. *Biochem J.*, **380(Pt 1)**:83-93.
88. Hartmann R, Justesen J, Sarkar SN, Sen GC, Yee VC. (2003). Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *Mol Cell.*, **12(5)**:1173-85.
89. Harroch S, Gothelf Y, Revel M, Chebath J. (1995). 5' upstream sequences of MyD88, an IL-6 primary response gene in M1 cells: detection of functional IRF-1 and Stat factors binding sites. *Nucleic Acids Res.*, **23(17)**:3539-46.

90. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guiet C, Briere F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EE. (2005). Human TLR10 Is a Functional Receptor, Expressed by B Cells and Plasmacytoid Dendritic Cells, Which Activates Gene Transcription through MyD88. *J Immunol.*, **174**(5):2942-50.
91. Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, **52**: 269-279.
92. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.*, **410**(6832):1099-103.
93. Hayden MS, Ghosh S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, **18**(18):2195-224.
94. Haziot A, Lin XY, Zhang F, Goyert SM. (1998). The induction of acute phase proteins by lipopolysaccharide uses a novel pathway that is CD14-independent. *J Immunol.*, **160**(6):2570-2.
95. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.*, **303**(5663):1526-9.
96. Heinz S, Haehnel V, Karaghiosoff M, Schwarzfischer L, Muller M, Krause SW, Rehli M. (2003). Species-specific regulation of Toll-like receptor 3 genes in men and mice. *J Biol Chem.*, **278**(24):21502-9.
97. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.*, **408**(6813):740-5.
98. Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S. (2003). The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol.*, **170**(6):3059-64.
99. Hemmi, H., (2004). The roles of two IKB Kinase-related Kinases in LPS and dsRNA Signaling and Viral Infection. *The Journal of Experimental Medicine.* **199**(12): 1641-1650.
100. Heylbroeck, C. et al. (2000). The IRF-3 Transcription Factor Mediates Senai Virus-Induced Apoptosis. *Journal of Virology*, **74**(8), 3781-3792.



101. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. (2003). CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, **124**(4):993-1000.
102. Hiscott J, Grandvaux N, Sharma S, Tenoevery BR, Servant MJ, Lin R. (2003). Convergence of the NF-kappaB and interferon signaling pathways in the regulation of antiviral defense and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, **1010**:237-48.
103. Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, Wagner C, Schmitz F, Schiemann M, Bauer S, Suter M, Wagner H. (2004). Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**(31):11416-21.
104. Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabeta K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. (2003). Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature*, **424**(6950):743-8.
105. Hoebe K, Janssen E, Beutler B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol*, **5**(10):971-4.
106. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Shamel L, Hartung T, Zahringier U, Beutler B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, **433**(7025):523-7.
107. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**(5418):1313-8.
108. Hoffmann JA. (2003). The immune response of Drosophila. *Nature*, **426**(6962):33-8.
109. Horisberger MA, Staeheli P, Haller O. (1983). Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**(7):1910-4.
110. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol*, **2**(9):835-41.
111. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, **420**(6913):329-33.
112. Hsu L. C. et al. (2004). The protein kinase PKR is required for macrophage apoptosis after activation of Toll-like receptor 4. *Nature*, **428**(6980):341-5.

113. Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ. (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102(5)**:1649-54.
114. Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med.*, **191(6)**:927-36.
115. Inohara N, Nunez G. (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.*, **3(5)**:371-82.
116. Isaacs A, Lindenmann J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.*, **147(927)**:258-67.
117. Jacquemont B, Roizman B. (1975). RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *J Virol.*, **15(4)**:707-13.
118. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*, 5<sup>th</sup> Edition, Garland Publishing, New York, 2001.
119. Janssens S, Burns K, Tschopp J, Beyaert R. (2002). Regulation of interleukin-1- and lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by alternative splicing of MyD88. *Curr Biol.*, **12(6)**:467-71.
120. Janssens S, Burns K, Vercammen E, Tschopp J, Beyaert R. (2003). MyD88S, a splice variant of MyD88, differentially modulates NF-kappaB- and AP-1-dependent gene expression. *FEBS Lett.*, **548(1-3)**:103-7.
121. Janssens S, Beyaert R. (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell.*, **11(2)**:293-302.
122. Jiang Z, Zamanian-Daryoush M, Nie H, Silva AM, Williams BR, Li X. (2003). Poly(I-C)-induced Toll-like receptor 3 (TLR3)-mediated activation of NFkappa B and MAP kinase is through an interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-independent pathway employing the signaling components TLR3-TRAF6-TAK1-TAB2-PKR. *J Biol Chem.*, **278(19)**:16713-9.
123. Jiang Z. et al. (2004). TLR3-mediated activation of NF-κB and IRF-3 diverges at TRIF. *PNAS*, **101(10)**: 3533-3538.
124. Kaisho T, Akira S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.*, **22(2)**:78-83.
125. Kaisho T, Akira S. (2001). Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand.*, **59(3)**:124-30.

126. Kaisho T, Akira S. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1589**(1):1-13.
127. Kamura T, Hara T, Kotoshiba S, Yada M, Ishida N, Imaki H, Hatakeyama S, Nakayama K, Nakayama KI. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(18):10231-6.
128. Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*, **279**(13):12542-50.
129. Karpova AY, Howley PM, Ronco LV. (2000). Dual utilization of an acceptor/donor splice site governs the alternative splicing of the IRF-3 gene. *Genes Dev*, **14**(22):2813-8.
130. Karpova AY, Ronco LV, Howley PM. (2001). Functional characterization of interferon regulatory factor 3a (IRF-3a), an alternative splice isoform of IRF-3. *Mol Cell Biol*, **21**(13):4169-76.
131. Katzung, B.G. (2001). *Basic & Clinical Pharmacology*, 8<sup>th</sup> Edition, Lange Medical Books/ McGraw Hill, San Francisco.
132. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**:115–22.
133. Kawai T. et al. (2001). LPS stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IRF-3 and the expression of a subset of LPS-inducible genes. *The Journal of Immunology*, **167**: 5887-5894.
134. Kawasaki K, Ernst RK, Miller SI. (2004). 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, **279**(19):20044-8.
135. Kipreos, E. T. et Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology*, **1**(5): 3002.1- 3002.7.
136. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, **110**(2):191-202.
137. Kochs G, Haller O. (1999). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem*, **274**(7):4370-6.

138. Kochs G, Haller O. (1999). Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96**(5):2082-6.
139. Koski GK, Kariko K, Xu S, Weissman D, Cohen PA, Czerniecki BJ. (2004). Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *J Immunol.*, **172**(7):3989-93.
140. Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG. (1995). The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and the tobacco viral resistance gene N. *Plant Cell.*, **7**(8):1195-206.
141. Lawrence JG, Ochman H. (1998). Molecular archaeology of the Escherichia coli genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95**(16):9413-7.
142. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell.*, **86**(6):973-83.
143. Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. (1997). Drosophila host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **94**(26):14614-9.
144. Li K, Foy E, Ferreón JC, Nakamura M, Ferreón AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M Jr, Lemon SM. (2005). Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102**(8):2992-7.
145. Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**(8):5567-72.
146. Lin, R. *et al.* (1998). Virus-dependant phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential and proteasome-mediated degradation. *Molecular and Cellular Biology*, **18**(5), 2986-2996.
147. Lin R, Heylbroeck C, Genin P, Pitha PM, Hiscott J. (1999). Essential role of interferon regulatory factor 3 in direct activation of RANTES chemokine transcription. *Mol Cell Biol.*, **19**(2):959-66.
148. Lin R, Genin P, Mamane Y, Hiscott J. (2000). Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol.*, **20**(17):6342-53.

149. Lin Y, Lee H, Berg AH, Lisanti MP, Shapiro L, Scherer PE. (2000). The Lipopolysaccharide-activated TLR4 Induces Synthesis of the Closely Related TLR2 in Adipocytes. *J Biol Chem.*, **275(32)**: 24255-24263.
150. Lin R, Noyce RS, Collins SE, Everett RD, Mossman KL. (2004). The herpes simplex virus ICP0 RING finger domain inhibits IRF3- and IRF7-mediated activation of interferon-stimulated genes. *J Virol.*, **78(4)**:1675-84.
151. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.*, **4(4)**:350-4.
152. Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA. (1990). Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene.*, **5(7)**:1095-7.
153. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.*, **198(3)**:513-20.
154. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **101(15)**:5598-603.
155. Maaser C, Heidemann J, von Eiff C, Luger A, Spahn TW, Binion DG, Domschke W, Luger N, Kucharzik T. (2004). Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol.*, **172(8)**:5056-62.
156. Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, LePage C, DeLuca C, Kwon H, Lin R, Hiscott J. (1999). Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene.* **237(1)**:1-14.
157. Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE 3rd, Freedman VH, Kaplan G. (2001). Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98(10)**:5752-7.
158. Mansell A, Brint E, Gould JA, O'Neill LA, Hertzog PJ. (2004). Mal interacts with tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-6 to mediate NF-kappaB activation by toll-like receptor (TLR)-2 and TLR4. *J Biol Chem.*, **279(36)**:37227-30.
159. Marie I, Hovanessian AG. (1992). The 69-kDa 2-5A synthetase is composed of two homologous and adjacent functional domains. *J Biol Chem.*, **267(14)**:9933-9.

160. Masson D, Tschopp J. (1985). Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem.*, **260(16)**:9069-72.
161. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.*, **171(6)**:3154-62.
162. Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T. (2004). Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses. *Microbiol Immunol.*, **48(3)**:147-54.
163. McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT, Maniatis T. (2004). IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101(1)**:233-8
164. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-97.
165. Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR, Hovanessian AG. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.*, **62(2)**:379-90.
166. Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J. (2004). RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat Immunol.*, **5(5)**:503-7.
167. Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. (2003). Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.*, **94(3)**:230-4.
168. Mori, M. *et al.* (2004). Identification of Ser-386 of IRF-3 as Critical Target for Inducible Phosphorylation That Determines Activation. *The Journal of Biological Chemistry*, **279(11)**: 9698-9702.
169. Mundschau LJ, Faller DV. (1995). Platelet-derived growth factor signal transduction through the interferon-inducible kinase PKR. Immediate early gene induction. *J Biol Chem.*, **270(7)**:3100-6.
170. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.*, **164(11)**:5998-6004.
171. Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M. (2005). Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-

dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem.*, **280(7)**:5491-5.

172. Nanduri S, Carpick BW, Yang Y, Williams BR, Qin J. (1998). Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.*, **17(18)**:5458-65.
173. Navarro L, David M. (1999). p38-dependent activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *J Biol Chem.*, **274(50)**:35535-8.
174. Nehyba J, Hrdlickova R, Burnside J, Bose HR Jr. (2002). A novel interferon regulatory factor (IRF), IRF-10, has a unique role in immune defense and is induced by the v-Rel oncoprotein. *Mol Cell Biol.*, **22(11)**:3942-57.
175. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW. (2002). Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? *Trends Immunol.*, **23(3)**:135-9.
176. Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature.*, **398(6724)**:252-6.
177. O'Neill LA. (2004). Immunology. After the toll rush. *Science.*, **303(5663)**:1481-2.
178. Ortaldo JR, Herberman RB, Harvey C, Osheroff P, Pan YC, Kelder B, Pestka S. (1984). A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **81(15)**:4926-9.
179. Oshiumi H. et al. (2003). TICAM-1, an adaptor molecule that participates in TLR3-mediated IFN- $\beta$  induction. *Nature Immunology*, **4(2)**: 161-167.
180. Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M, Seya T. (2003). TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem.*, **278(50)**:49751-62.
181. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology.*, **113(2)**:153-62.

182. Panne, D., Maniatis, T., Harrison, S.C., (2004). Crystal structure of ATF-2/c-Jun and IRF-3 bound to the interferon- $\beta$  enhancer. *The EMBO Journal*, **23**, 4384-4393.
183. Parekh BS, Maniatis T. (1999). Virus infection leads to localized hyperacetylation of histones H3 and H4 at the IFN-beta promoter. *Mol Cell*. **3(1)**:125-129.
184. Parker JE, Coleman MJ, Szabo V, Frost LN, Schmidt R, van der Biezen EA, Moores T, Dean C, Daniels MJ, Jones JD. (1997). The Arabidopsis downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *Plant Cell*, **9(6)**:879-94.
185. Pasare C, Medzhitov R. (2003). Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance. *Curr Opin Immunol.*, **15(6)**:677-82.
186. Pasare C, Medzhitov R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, **299(5609)**:1033-6.
187. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.*, **22(2)**:153-83.
188. Peiser L, De Winther MP, Makepeace K, Hollinshead M, Coull P, Plested J, Kodama T, Moxon ER, Gordon S. (2002). The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for Neisseria meningitidis which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses. *Infect Immun.*, **70(10)**:5346-54.
189. Pestka S, Krause CD, Walter MR. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.*, **202**:8-32.
190. Petryshyn R, Chen JJ, London IM. (1988). Detection of activated double-stranded RNA-dependent protein kinase in 3T3-F442A cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **85(5)**:1427-31.
191. Pickart, C. (2001). Ubiquitin Enters the New Millenium. Meeting Review. *Molecular Cell*, vol.8, p.499-504.
192. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, **282(5396)**:2085-8.
193. Pomerantz JL, Baltimore D. (1999). NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J.*, **18(23)**:6694-704.



194. Qin, BY, et al. (2003). Crystal Structure of IRF-3 Reveals Mechanism of Autoinhibition and Virus-Induced Phosphoactivation. *Nature Structural Biology*, **10(11)**: 913-921.
195. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med.*, **189(4)**:615-25.
196. Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.*, **11(6)**:753-61.
197. Raulet DH. (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol.*, **5(10)**:996-1002.
198. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. (1998). Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med.*, **188(11)**:2175-80.
199. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. (1998). A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95(2)**:588-93.
200. Ross GD. (2000). Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol.*, **20(3)**:197-222.
201. Rotta G, Edwards EW, Sangaletti S, Bennett C, Ronzoni S, Colombo MP, Steinman RM, Randolph GJ, Rescigno M. (2003). Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med.*, **198(8)**:1253-63.
202. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lippa P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol.*, **34(9)**:2541-50.
203. Sarkar SN, Miyagi M, Crabb JW, Sen GC. (2002). Identification of the substrate-binding sites of 2'-5'-oligoadenylate synthetase. *J Biol Chem.*, **277(27)**:24321-30.
204. Sarkar SN, Smith HL, Rowe TM, Sen GC. (2003). Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem.*, **278(7)**:4393-6.
205. Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC. (2004). Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol.*, **11(11)**:1060-7.

206. Sasu S, LaVerda D, Qureshi N, Golenbock DT, Beasley D. (2001). Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ Res.*, **89(3)**:244-50.
207. Sato S. et al. (2003). Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- $\beta$  (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- $\kappa$ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the TLR Signaling. *The Journal of Immunology*, **171**: 4304-4310.
208. Schromm AB, Lien E, Henneke P, Chow JC, Yoshimura A, Heine H, Latz E, Monks BG, Schwartz DA, Miyake K, Golenbock DT. (2001). Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J Exp Med.*, **194(1)**:79-88.
209. Schulman, B.A. (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature*, **408**: 381-386.
210. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. (1990). Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.*, **249(4975)**:1429-31.
211. Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R, Hiscott J. (2001). Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem.*, **276(1)**:355-63.
212. Servant, M., Grandvaux N., Hiscott J. (2002). Multiple signalling pathways leading to the activation of IRF-3. *Biochemical Pharmacology.*, **64**, 985-992.
213. Servant, M. et al. (2003). Identification of the Minimal Phosphoacceptor Site Required for *in Vivo* Activation of Interferon Regulatory Factor 3 in Response to Virus and dsRNA. *The Journal of Biological Chemistry.*, **278(11)**: 9441-9447.
214. Servant, M., Tenoevery, B., Lin, R. (2002). Overlapping and Distinct Mechanisms Regulating IRF-3 and IRF-7 Function. *Journal of Interferon and Cytokine Research.*, **22**: 49-58.
215. Seya T, Oshiumi H, Sasai M, Akazawa T, Matsumoto M. (2005). TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol.*, **37(3)**:524-9.

216. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. (2003). Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science*, **300**: 1148-1151.
217. Silva AM, Whitmore M, Xu Z, Jiang Z, Li X, Williams BR. (2004). Protein kinase R (PKR) interacts with and activates mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) in response to double-stranded RNA stimulation. *J Biol Chem.*, **279(36)**:37670-6.
218. Sing, A. et al. (2000). Bacterial Induction of Beta Interferon in Mice Is a Function of the Lipopolysaccharide Component. *Infection and Immunity*, **68(3)** :1600-1607.
219. Smith, EJ. et al. (2001). IRF3 and IRF7 Phosphorylation in Virus-infected Cells Does Not Require Double-stranded RNA-dependent Protein Kinase R or **IKB** Kinase but Is Blocked by Vaccinia Virus E3L Protein. *J. Biol. Chem.*, **276(12)**, 8951-8957.
220. Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.*, **4(12)**:1247-53.
221. Spiegel M, Pichlmair A, Martinez-Sobrido L, Cros J, Garcia-Sastre A, Haller O, Weber F. (2005). Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. *J Virol.*, **79(4)**:2079-86.
222. Stark, GR. (1998). How Cells Respond to Interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**: 227-264.
223. Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, Finlay BB. (1999). Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol.*, **1(1)**:33-49.
224. Steele-Mortimer O. et al. (2000). Activation of Akt/Protein Kinase B in Epithelial Cells by the S. Typhimurium Effector SigD. *The Journal of Biological Chemistry*, **275(48)** : 37718-37724.
225. Stover AG, Da Silva Correia J, Evans JT, Cluff CW, Elliott MW, Jeffery EW, Johnson DA, Lacy MJ, Baldridge JR, Probst P, Ulevitch RJ,

- Persing DH, Hershberg RM. (2004). Structure-activity relationship of synthetic toll-like receptor 4 agonists. *J Biol Chem.*, **279(6)**:4440-9.
226. Sumbly P, Barbian KD, Gardner DJ, Whitney AR, Welty DM, Long RD, Bailey JR, Parnell MJ, Hoe NP, Adams GG, Deleo FR, Musser JM. (2005). Extracellular deoxyribonuclease made by group A *Streptococcus* assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102(5)**:1679-84.
  227. Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr. (2005). Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol.*, **79(5)**:2689-99.
  228. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B. (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **101(10)**:3516-21.
  229. Takahashi K, Suzuki NN, Horiuchi M, Mori M, Suhara W, Okabe Y, Fukuhara Y, Terasawa H, Akira S, Fujita T, Inagaki F. (2003). X-ray crystal structure of IRF-3 and its functional implications. *Nat Struct Biol.*, **10(11)**:922-7.
  230. Takeda K, Kaisho T, Akira S. (2003). Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.*, **21**:335-76.
  231. Takeda K, Akira S. (2004). Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci.*, **34(2)**:73-82.
  232. Takeda K, Akira S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin Immunol.*, **16(1)**:3-9.
  233. Takeda K, Akira S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.*, **17(1)**:1-14.
  234. Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S. (1999). TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene.*, **231(1-2)**:59-65.
  235. Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.*, **13(7)**:933-40.
  236. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.*, **169(1)**:10-4.

237. Tamura T, Tailor P, Yamaoka K, Kong HJ, Tsujimura H, O'Shea JJ, Singh H, Ozato K. (2005). IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. *J Immunol.*, **174**(5):2573-81.
238. Taniguchi T, Harada H, Lamphier M. (1995). Regulation of the interferon system and cell growth by the IRF transcription factors. *J Cancer Res Clin Oncol.*, **121**(9-10):516-20.
239. Taniguchi M, Seino K, Nakayama T. (2003). The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol.*, **4**(12):1164-5.
240. Tobias PS, Soldau K, Gegner JA, Mintz D, Ulevitch RJ. (1995). Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. *J Biol Chem.*, **270**(18):10482-8.
241. Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K. (2004). Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.*, **32**(2):643-52.
242. Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol.*, **166**(4):2372-7.
243. Visintin A, Mazzone A, Spitzer JA, Segal DM. (2001). Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98**(21):12156-61.
244. Visintin A, Latz E, Monks BG, Espevik T, Golenbock DT. (2003). Lysines 128 and 132 enable lipopolysaccharide binding to MD-2, leading to Toll-like receptor-4 aggregation and signal transduction. *J Biol Chem.*, **278**(48):48313-20.
245. Voet & Voet. (1998). *Biochimie*, 2e édition américaine, DeBoeck Université.
246. Von der Lehr, N. et al. (2003). Implication of the Ubiquitin/Proteasome System in Myc-Regulated Transcription. *Cell Cycle*, **2**(5): 403-407.
247. Wagner H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol.*, **25**(7):381-6.
248. Walters JR. (2005). Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol.*, **21**(2):135-40.

249. Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, **78**(6):1101-15.
250. Wilkinson, K.D., Urban, M.K. & Haas, A.L. (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **255** 7529-7532.
251. Williamson AR. (1976). The biological origin of antibody diversity., *Annu Rev Biochem.*, **45**:467-500.
252. Winkelmann G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans.*, **30**(4):691-6.
253. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. (2001). Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.*, **104**(25):3103-8.
254. Yamamoto M. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN- $\beta$  promoter in the TLR signaling. *The Journal of Immunology*, **169**: 6668-6672.
255. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.*, **420**(6913):324-9.
256. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.*, **301**(5633):640-3.
257. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.*, **4**(11):1144-50.
258. Yang J, Goetz D, Li JY, Wang W, Mori K, Setlik D, Du T, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Strong R, Barasch J. (2002). An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell.*, **10**(5):1045-56.
259. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, Fujita T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J.*, **17**(4):1087-95.

260. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.*, **5**(7):730-7.
261. Zhang G, Ghosh S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*, **277**(9):7059-65.
262. Zhang J, Xu LG, Han KJ, Wei X, Shu HB. (2004). PIASy represses TRIF-induced ISRE and NF-kappaB activation but not apoptosis. *FEBS Lett.*, **570**(1-3):97-101.
263. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, Ghosh S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.*, **303**(5663):1522-6.
264. Zheng N. et al. (2002). Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-Fbox/Skp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature*, **416**: 703-709.
265. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. (1993). Expression cloning of 2'-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell.*, **72**(5):753-65.
266. Zimring, JC. (1998). Human Herpes Virus 8 Encodes an IRF Homologue that Represses IRF-1-Mediated Transcription. *Journal of Virology*. **72**(1): 701-707.
267. Tanaka K, Tsurumi C. (1997). The 26S proteasome: subunits and functions. *Mol Biol Rep*, **24**(1-2): 3-11.
268. Barnes B.J., Field A.E., Pitha-Rowe P.M. (2003). Virus-induced heterodimer formation between IRF-5 and IRF-3 modulates assembly of the IFNA enhanceosome in vivo and transcriptional activity IFNA genes. *J Biol Chem*, **278**: 16630-16641.

